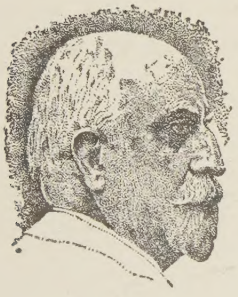
VOLUMEN 10 OCTUBRE-DICIEMBRE 1957 NUM. 4

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles



INSP
RAM
MM

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

SUMARIO

Págs.

El ciclo «L» de las bacterias, por *Miguel Rubio Huertos.* 361

La flora bacteriana del tabaco, por *Antonio Izquierdo Tamayo* 387

Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. I. Selección de mutantes, medio de esporulación y factores de preparación del medio de fermentación, por *José Luis Malo Echevarría* y *Benito Regueiro Varela* 425

Obtención de un «híbrido ilegítimo» de *Saccharomyces delbrueckii,* por *Juan Santa María* 451

Estudios sobre metabolismo de los ácidos nucleicos de las bacterias. I. Relación entre crecimiento y contenido en ácidos nucleicos de bacterias en caldo común, por *Ramona Vaamonde Fernández* y *Benito Regueiro Varela.* 461

Nuevo Director 485

VOLUMEN 10 1957

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 30 pesetas. Suscripción anual (4 números): 110 pesetas.

SUMARIO DEL NUM. 1

Charles Thom (†) 1

Flora bacteriana Gram-positiva en infecciones del aparato urinario. I. Identificación, frecuencia y antibiograma, por *A. Socías* y *A Portolés* 5

Un nuevo tipo de inclusiones intracelulares producidas por virus en las plantas, por *Miguel Rubio Huertos* 43

Identificación de bacteriófagos mediante técnicas serológicas. II. Bacteriófagos procedentes de personas afectas de infección del aparato uro-genital, por *María Luisa Alonso* 53

¿La *Salmonella typhica* adquiere resistencia frente al cloramfenicol?, por *J. Vidal Munné* y *J. Vidal Tort* 61

Estudios sobre purificación y desantigenización enzimática de sueros y plasmas antitóxicos. III. Estudio teórico de las valoraciones de la función antitóxica y anafiláctica de los sueros y plasmas antitóxicos, por *F. Cordón* y *A. Martínez* 69

Acción de los agentes químicos sobre los virus y experiencias con el antivariólico cultivado en huevos de gallina, por *M.ª Luisa Alonso* 99

Estudio y control analítico microbiológico del papel moneda, por *E. Gastón de Iriarte* y *M.ª Lourdes Lloveras.* 115

SUMARIO DEL NUM. 2

Consideraciones acerca de la valoración de la eficacia de las vacunas antitetánicas, por *Florencio Moreno de Vega* 151

Acción de los agentes químicos sobre los virus y experiencias con el antivariólico cultivado en huevos de gallina (conclusión), por *M.ª Luisa Alonso* 159

Nota sobre algunas modificaciones introducidas en la tinción de núcleos de microorganismos, por *Carlos Ramírez Gómez* 201

Formación de 6-metil ácido salicílico por el *Penicillium patulum* Bainier, por *R. Lahoz* y *Domingo Rodríguez.* 205

Contribución al estudio de la ecología de las levaduras. I. Estudio de levaduras aisladas de hongos carnosos, por *Carlos Ramírez Gómez* 215
Actas de la Sociedad 249

SUMARIO DEL NUM. 3

Excmo. Sr. D. Arnaldo Socías Amorós (†), por *J. del Campo Lawday* 251
«Cromosomas ligados» y «Mitosis elementales» en los núcleos de *Aspergillus, por A. Socías* (†) y *C. Ramírez Gómez* 259
Contribución al estudio de la microbiología de los embutidos, por *A. Socías* (†) y *J. Pérez Silva* 287
Citología y ciclos vitales del género *Rhizobium* Frank, por *Miguel Rubio Huertos* y *Genovena Tejerina Domínguez.* 305
Influencia del pH y la salinidad en el desarrollo de *Lactobacillus plantarum*, por *Antonio Izquierdo Tamayo* ... 325
Estudio bacteriológico de la putrefacción en la merluza, por *Genoveva Tejerina Domínguez* 345

SUMARIO DEL NUM. 4

El ciclo «L» de las bacterias, por *Miguel Rubio Huertos*... 361
La flora bacteriana del tabaco, por *Antonio Izquierdo Tamayo* 387
Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. I. Selección de mutantes, medio de esporulación y factores de preparación del medio de fermentación, por *José Luis Malo Echevarría* y *Benito Regueiro Varela* 425
Obtención de un «híbrido ilegítimo» de *Saccharomyces delbrueckii*, por *Juan Santa María* 451
Estudios sobre metabolismo de los ácidos nucleicos de las bacterias. I. Relación entre crecimiento y contenido en ácidos nucleicos de bacterias en caldo común, por *Ramona Vaamonde Fernández* y *Benito Regueiro Varela.* 461
Nuevo Director 485

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

EL CICLO «L» DE LAS BACTERIAS

POR

MIGUEL RUBIO HUERTOS (*)

En 1935, Klienerberger-Nobel observó en unos cultivos de *Streptobacillus moniliformis* un curioso organismo muy diferente, por sus dimensiones, su morfología y los caracteres de sus colonias, de la bacteria normal, y que se parecía enormemente a los agentes de la plerineumonía de los bóvidos y de la agalaxia contagiosa de las cabras y ovejas. K. Nobel dió el nombre de formas «L» *(large bodies)* a los cuerpos redondeados y grandes *(large)* que encontró en estos cultivos; de aquí el origen del nombre formas «L» para designar al conjunto de estas formas en adelante.

Al conseguir Klienerberger-Nobel aislar en un cultivo puro esta fase, pensó que se trataba de un organismo específico que se encontraba en simbiosis con las bacterias normales, hasta que Dienes, estudiando el mismo fenómeno, probó que era una fase de la propia bacteria y que forma parte de un ciclo reproductivo de ésta, concepto actualmente admitido por todos los autores, incluyendo a K. Nobel.

En 1939 Dienes observó, sin poder aislarlas, formas semejantes en cultivo de *Escherichia coli*, de *Haemophilus influenzae, parainfluenzae, Proteus vulgaris, Salmonella* y *Shigella*, y pudo aislarlas en cultivo puro, a partir de cepas de *B. flavobacterium* y de *Bacteroides funduliformis*.

Algo más tarde Pierce mostró en *Streptobacillus moniliformis* que las formas «L» de este germen son muy resistentes a la penicilina, mientras que las formas normales son muy sensibles al antibiótico. Esta propiedad se ha revelado posteriormente como general para todas las formas «L».

(*) Dirección actual: Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología, Joaquín Costa, 32, Madrid.

En seguida se comprobó que no sólo las formas «L» eran resistentes a la penicilina, sino que parecían ser resistentes, en general, a una gran cantidad de agentes disgenésicos de diferente naturaleza, como el envejecimiento de los medios de cultivo, pequeñas concentraciones de sales minerales, fenol, algunos aminoácidos como la glicocola, otros antibióticos además de la penicilina, la acción de un bacteriófago débil, las bajas temperaturas, etc. (4, 8, 16, 18, 25).

Una vez comprobada esta resistencia, se ha empleado para la inducción de las formas «L» en cultivos normales de bacterias, ya que su aparición espontánea es escasa y difícil de comprobar. Así, el medio empleado actualmente para la obtención de formas «L», o inducción del ciclo completo en una bacteria, es la adición de penicilina o glicocola a medios de cultivo, o bien el ataque por medio de un bacteriófago débil a un cultivo muy reciente de la misma.

La mayoría de los autores que han trabajado en formas «L» de diferentes bacterias se han limitado a su descripción y a la de los métodos empleados en la obtención, observación y aislamiento de dichas formas. Sin embargo, tanto Klienerberger-Nobel en Inglaterra, 1951, Dienes y Weimberger en los Estados Unidos y Tulasne en Francia, 1953, han relacionado las distintas formas «L» de manera que, partiendo de la forma normal, se llega otra vez a ella a través de una forma grande globosa y una fase filtrable, todo unido por una serie de formas intermedias constituyendo un ciclo.

En la interpretación de los hechos observados, así como en la concatenación de las distintas fases del ciclo, existen algunas diferencias entre los autores citados.

En 1954 presentamos una interpretación propia del ciclo «L» basada en un estudio morfológico de diversos tipos de bacterias, por medio de los microscopios de contraste de fases, normal y electrónico, completado con experiencias de filtración.

Kellemberger, Liebermeister y Bonifas, en 1956, trabajando con *Proteus vulgaris*, presentan también un ciclo «L» que coincide exactamente con el publicado por nosotros.

Ultimamente los trabajos sobre formas P. P. L. O. («pleripneumonia-like organisms») y protoplastos, muy relacionados con las formas «L», vienen a dar un mayor interés al estudio de este ciclo.

Basados en nuestras experiencias anteriores con diferentes especies de *Pseudomonas, Proteus vulgaris* y *Rhizobium* principalmente, y las

realizadas en 1956 y 1957 sobre las formas «L» del *Agrobacterium tumefaciens* (20), y otra bacteria Gram negativa aislada de tumores de «Crown-gall», cuyos resultados no se han publicado, describimos a continuación la inducción y marcha del ciclo «L» para discutir, más tarde, las diferencias con las interpretaciones del ciclo «L» dadas por otros autores y las relaciones entre formas «L», protoplastos, formas P. P. L. O. y las llamadas formas de involución.

INDUCCION DEL CICLO «L»

Empleamos penicilina 5.000 a 10.000 U. I. por centímetro cúbico, o una solución acuosa estéril de glicocola al 1, al 5 o al 10 por 100, según la bacteria (*). Se utilizan tubos de caldo agar inclinado, recién sembrado, y se añaden 3-4 c. c. de la solución de penicilina o glicocola de manera que quede el líquido cubriendo la parte inferior del agar (fig. 1 *a*). Las formas «L» se forman en la zona de difusión del líquido en el agar, y así se consigue una escala de concentración. También se ha hecho lo mismo en placas en las que se había inclinado un poco el agar de manera que el líquido quede en una zona y parte del agar en seco (fig. 1 *b*).

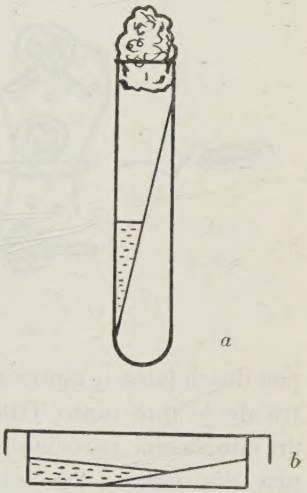


FIG. 1.

MARCHA DEL CICLO «L»

Al poco tiempo de ser añadido el antibiótico o la glicocola se observa la muerte y lisis de gran número de bacterias; pero otras, aunque paralizan su división, crecen hasta alcanzar tamaños variables, siempre mayores que la forma normal, y en algunos casos (*Ps. fluorescens* + penicilina) adquieren longitudes enormes. Al mismo tiempo hemos podido

(*) Las cantidades de penicilina o glicocola deben verse en cada caso particular (18).

comprobar cómo estas formas gigantes se hacen más transparentes, según observó Klienerberger-Nobel.

Formación de la fase «L» grande.

Las formas bacilares mayores que las normales se hinchan por algunos puntos. Generalmente en uno de sus extremos, pero también es corriente que sea en el centro, y estas protuberancias parece que van absorbiendo el resto de la bacteria, hasta quedar formado un solo cuerpo globoso, o discoidal, o bien se desprenden de la forma bacilar quedando libres. En este momento hemos podido demostrar que estos cuer-

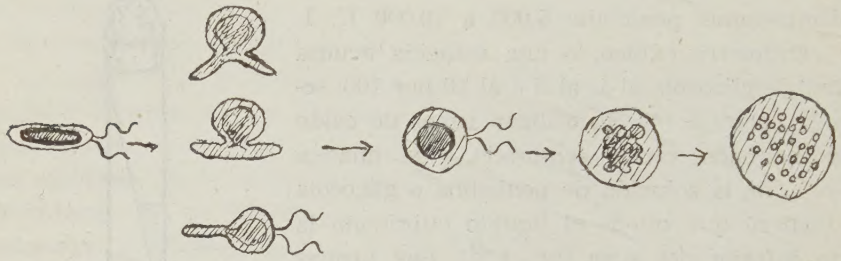


FIG. 2.

pos discoidales o globosos poseen una membrana bien definida, en contra de lo que tanto Tulasne como K.-Nobel y otros autores sostienen, un citoplasma parecido al de una bacteria normal y una zona homogénea más opaca a los electrones en el centro, también parecida a la zona central de un bacilo (formas intermedias, fotos 5, 6 y 7). Otra de las cosas que hemos podido demostrar es la presencia de flagelos en estas formas, en los casos del *Proteus vulgaris* y *Ps. fluorescens,* no sólo por las microfotografías electrónicas, sino por haber podido observar su movimiento en el microscopio de contraste de fases.

Una vez liberados estos cuerpos discoidales, aumentan de tamaño y su parte central homogénea y compacta se divide progresivamente en gránulos, cada vez menores, su membrana se va haciendo cada vez más débil, alcanzando en este punto la madurez, o sea son ya lo que denominamos forma «L» grande. Estas formas, a veces, aparecen vacuoladas, sobre todo cuando se observan con el microscopio de contraste de fases.

Formación de la fase filtrable.

Las formas «L» grandes pueden sufrir dos caminos diferentes de transformación: una, para dar lugar a la forma normal de nuevo, y otra, en determinadas condiciones, para dar las formas filtrables o formas «L» enanas.

Si las condiciones disgenésicas se prolongan y, posiblemente, por la intervención de otros factores aún no bien determinados, la mayoría o

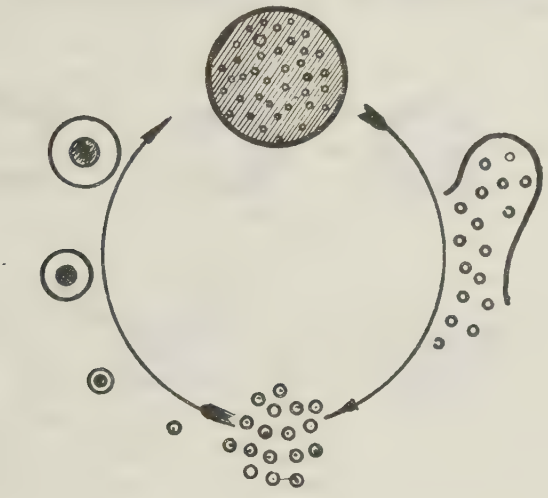


FIG. 3.

todas las formas «L» grandes liberan las formas filtrables por rotura de su membrana. Según las microfotografías electrónicas, estas formas discoidales de un tamaño de 0,1 a 0,3 micras de diámetro, parecen tener también membrana, citoplasma y una parte central más opaca a los electrones, como un núcleo. Hasta 1954 (21) no se había conseguido obtener microfotografías electrónicas de estas formas que no dejasen lugar a dudas sobre su naturaleza. En éstas que presentamos están muy claros los detalles que acabamos de describir, y además se puede observar que estas formas poseen un crecimiento que las lleva a alcanzar el tamaño de las formas intermedias descritas para la formación de los cuerpos «L» grandes, con la misma morfología, excepto la presencia de flagelos, originándose de nuevo las formas «L» grandes, cerrando así el ciclo secundario, como puede verse en el esquema adjunto (fig. 3).

Paso de la forma «L» grande a forma normal.

Según Stempen y Hutchinson en observaciones hechas en vivo con *Proteus* x 19, las formas «L» grandes regeneran de nuevo la forma normal por un alargamiento de la forma globosa, hasta formar un bacilo que se divide subsecuentemente de forma corriente.

Nosotros hemos observados algo muy parecido en *Proteus:* de una forma globosa grande crecen extrusiones del plasma en diferentes planos, dando lugar a cadenas de bacterias normales (fig. 4 *b).*

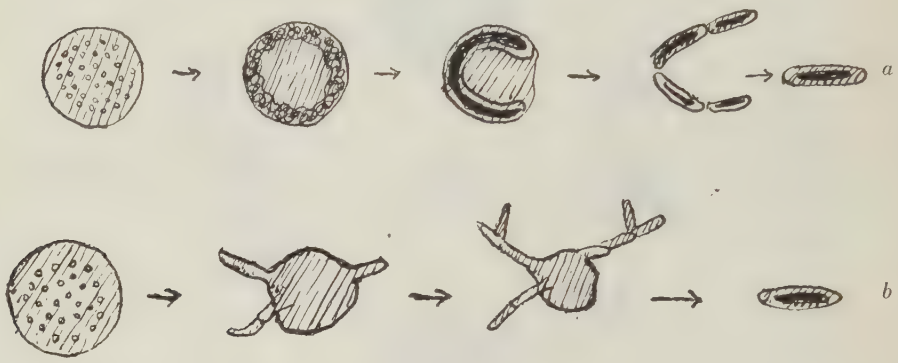


FIG. 4.

Tulasne ha descrito la división de cuerpos globosos en tres o más formas bacilares por fragmentación. Nosotros, en todas las experiencias, no hemos podido comprobar esta manera de formarse la bacteria normal, sino otra transformación gradual, en la que los gránulos cromatínicos se sitúan en forma anular, quedando una vacuola en el centro de la forma «L» grande. Una vez formado este anillo de gránulos parecen unirse entre ellos, dando una masa homogénea que se rodea de una membrana propia. Más tarde el anillo compacto así formado se rompe por un lado, dejando unas formas en herradura, a veces unidos sus brazos todavía por restos de la membrana primitiva del cuerpo «L» grande, membrana que se reasorbe, dejando libre una forma bacilar encorvada, que luego se divide, dando las formas normales (fig. 4 *a).*

Esta manera de regenerar la forma normal la hemos podido observar en *Proteus vulgaris* y *Ps. fluorescens.*

Aspecto macroscópico del fenómeno. Colonias «L».

Igual que existe un cambio morfológico al pasar de las formas normales a las formas «L» apreciable al microscopio, este cambio se traduce sobre el plano macroscópico por un tamaño y una morfología de las colonias «L» que difieren de las normales.

Las colonias «L», es decir, las formadas por los diversos elementos «L» («L» grandes, «L» pequeños y formas intermedias) son muy pequeñas, difíciles de ver; se deben mirar con luz lateral, que incida sobre la superficie del agar, y entonces resaltan como pequeños puntitos traslúcidos, poco levantados y brillantes. Estas colonias están constituídas por formas «L» pequeñas en su mayor parte, restos de formas «L» grandes, flagelos, etc., y algunas formas «L» grandes aún intactas.

Las colonias «L», en las cuales predominan los elementos «L» grandes, son muy inestables, pues muchas de estas formas pasan a dar la forma normal, modificándose entonces el aspecto de la colonia, ya que se levanta en su borde un anillo más denso lechoso, y pronto toda la colonia «L» queda oculta o reemplazada por una colonia normal.

Nosotros hemos podido obtener colonias «L» por dos caminos diferentes: a partir de filtrados, sembrando con pipeta en tubos de agar inclinado el sedimento tenue que aparece en los tubos de filtrado al cabo de cierto tiempo de incubación, y a partir de la forma normal tratándola con glicina o penicilina, en tubos o en placas de Petri.

Experiencias de filtración.

Hemos hecho diversos experimentos de filtración utilizando filtros Seitz, a veces sin tratar la bacteria por ningún agente de tipo químico o biológico, para que, al hacer el filtrado, este agente no pasase también y pudiese actuar sobre las formas filtrables, pues no sabíamos el efecto que sobre ellas pudiera producir; en este caso inducimos la formación de elementos «L» por envejecimiento del cultivo líquido; en otros casos hemos utilizado una mezcla de microorganismos del suelo, en donde suponíamos que alguna de las bacterias pudiera encontrarse en forma filtrable, precisamente a causa de las acciones antagónicas entre unos y otros microorganismos, y, por último, hemos realizado la filtración de una suspensión en agua destilada, de colonias «L», inducidas por peni-

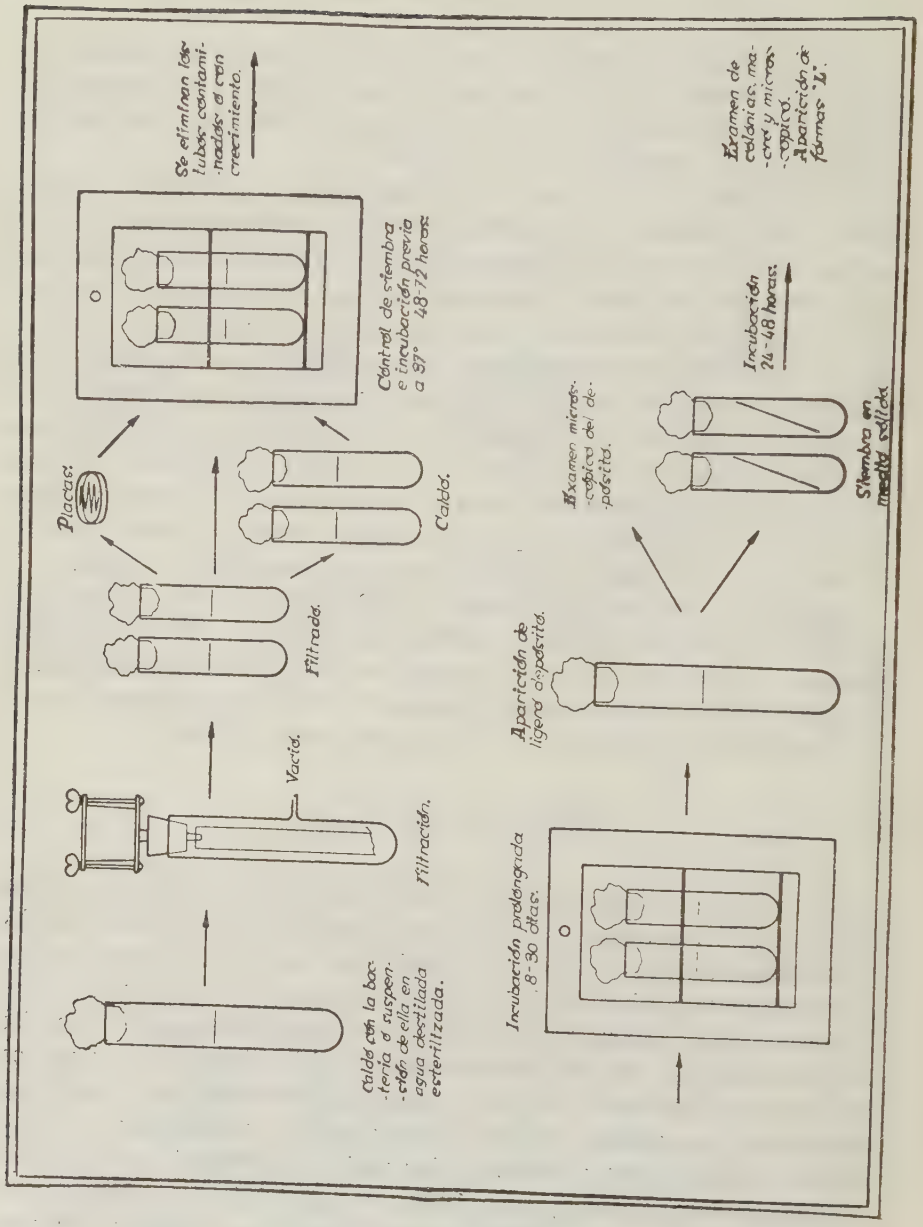

Se eliminan los tubos contaminados o con crecimiento.
Placas.
Control de siembra e incubación previa a 37° 48-72 horas.
Cabd.
Filtrado.
Vacío.
Filtración.
Caldo con la bacteria o suspensión de ella en agua destilada esterilizada.
Incubación prolongada 8-30 días.
Aparición de ligera disperita.
Examen microscópico del depósito.
Incubación 24-48 horas.
Siembra en medio sólido.
Examen de colonias macro y microscópico. Aparición de formas "L".

FIG. 5.

cilina, seguido de ultracentrifugación del filtrado para observar el sedimento en el microscopio electrónico.

En los experimentos de filtración es de la mayor importancia el control de los filtrados, y el esperar tiempo suficiente durante la incubación para obtener resultados (esquema de la fig. 5). A veces es necesario esperar de quince a cuarenta días hasta que aparezca un leve depósito en el fondo del tubo con el líquido filtrado. (El probar los filtrados a las veinticuatro a treinta y seis horas y ver que estaban estériles ha llevado a muchos investigadores a dejar el experimento.) Los resultados han sido los siguientes:

Con *Proteus vulgaris* sembrado en medio líquido (caldo glucosado) y dejando envejecer a temperatura ambiente durante treinta días, tras cuarenta y ocho horas de incubación a 37° C., hicimos filtrados que, una vez pasados por el control, incubamos a 37° durante ocho-doce días, al cabo de los cuales, y al presentarse un depósito tenue, resembramos en tubo inclinado de agar lactosado y tornasol, observando al cabo de tres-cuatro días la aparición de las pequeñísimas colonias «L» en algunos de los tubos, y en otros estas colonias y algunas de tipo normal (16).

La morfología de los elementos encontrados en las colonias pequeñas corresponde a formas «L» diversas.

Resembrando de estas colonias en nuevo medio encontramos a las veinticuatro horas que, lo mismo las nuevas colonias formadas que sus elementos, correspondían a la forma normal del *Proteus*.

Hemos obtenido el mismo resultado en cuanto a la morfología del depósito formado en los filtrados con la mezcla de bacterias del suelo; pero en este caso, al resembrar en tubo inclinado en primera fase, se formaban rápidamente colonias de elementos normales de un bacilo esporulado igual a un microorganismo aislado de la mezcla antes del filtrado, sin formarse colonias «L» (26).

En el caso del filtrado de colonias «L» de *Ps. fluorescens* hicimos una ultracentrifugación después de control para evitar contaminaciones, etcétera, pero sin dejar pasar más de tres días, y vimos que únicamente habían pasado formas filtrables de tamaño homogéneo y en muy reducido número.

El ciclo «L» completo, por lo tanto, responde al esquema de la figura 6.

La parte primera del esquema, que representa el paso de la forma normal a «L» grande, y también el paso de dicha forma «L» grande a la normal otra vez, ha sido comprobado principalmente gracias a observa-

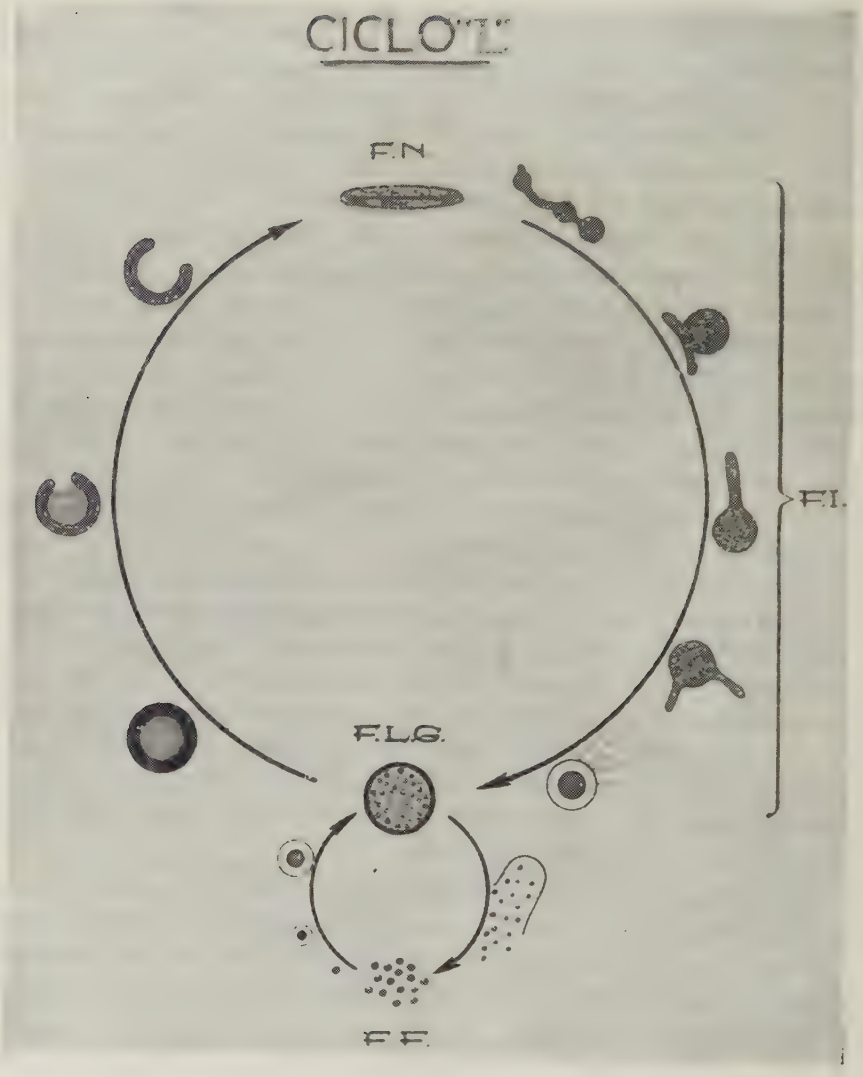


FIG. 6.

ciones con el microscopio electrónico (fotos 2, 3, 4, 5); la formación de la fase filtrable sólo ha podido ser claramente observada por medio del microscopio electrónico, y su comprobación la hemos realizado por medio de los experimentos de filtración anteriormente descritos.

En general, este ciclo coincide, en su mayor parte, con los descritos por Klieneberger-Nobel y Tulasne y Dienes, aunque existen diferencias, como, por ejemplo, el modo de formación de cuerpos «L» grandes, que, según K.-Nobel, se forman por reunión de pequeños gránulos o salen de lazos formados por el cuerpo bacteriano deformado en un largo filamento. De todas formas, esto sólo ha sido observado por dicho autor. Los demás investigadores están de acuerdo en una formación de cuerpos «L» grandes a partir de la forma normal, según lo hemos descrito nosotros.

Respecto a la presencia de membrana en las formas intermedias grandes, e incluso filtrables, como ha sido postulado por nosotros (1954, 1955, 1956), lo hemos podido comprobar perfectamente en nuestras observaciones con el microscopio electrónico y por sus reacciones osmóticas, y fué confirmado por Stemphen en 1956 trabajando sobre *Proteus* por medio de reacciones histoquímicas. Es ésta una cuestión de interés en la cual queremos insistir, pues es posible que se trate de una característica típica de las formas «L» producidas por ciertas bacterias y su diferencia con el concepto de «Protoplastos».

En las bacterias existen dos tipos de cubiertas celulares: la pared celular rígida («cell wall») y la membrana celular que se encuentra entre aquélla y el protoplasto. La explicación que generalmente se ha dado a la formación de cuerpos esféricos, tanto en el caso de las formas «L» como en la producción de protoplastos con lisozima, es que se originan por la destrucción parcial o total de la pared celular. Existe otra alternativa que no se ha tenido en cuenta, y es que, refiriéndonos sólo a las formas «L», se podrían formar cuerpos esféricos por un auténtico crecimiento organizado, y, a veces, parece ser éste el caso (Stempen y Hutchinson, 1951), aunque todavía no se ha podido llegar a probar definitivamente. El fenómeno de plasmoptisis (extrusión del plasma para formar una esfera), de todas formas, no puede ser explicado como fenómeno puramente osmótico, según Weibull (1956).

En las formas «L» está probado que existe una modificación de la pared celular que nosotros creemos progresiva, y llega un momento en que puede desaparecr del todo, dependiendo entonces de la estructura

más o menos fuerte de la membrana celular las propiedades osmóticas de la forma «L»; la estructura y características de la membrana celular pudieran variar según la especie bacteriana, y por ello se observan diferencias en el comportamiento ante las condiciones osmóticas en formas «L» producidas por bacterias diferentes (*); por ello, algunos autores no habrán podido observar la presencia de membrana (si ésta era muy tenue).

En el caso de la liberación de las formas filtrables, la modificación, tanto de la pared celular como de la membrana, llega al límite y se lisan completamente.

La modificación que sufren las membranas celulares parece ser de tipo reversible, ya que, a partir de las formas filtrables, se regeneran de nuevo las formas «L» grandes, y de ahí, según el medio en que se encuentren, se puede regenerar la bacteria normal otra vez.

En el ciclo propuesto por Tulasne se supone que las formas filtrables se multiplican además por división. Nosotros no hemos podido observar esta característica, y creemos que no existen pruebas concluyentes de ello. El hecho del crecimiento gradual de las formas filtrables observado por los distintos autores, y que se ve claramente en nuestras fotografías electrónicas (foto 10), y el que, a partir de filtrados, tras un período de incubación, parezcan las formas «L» grandes y algunas intermedias, prueban que la multiplicación se efectúa a través de las formas «L» grandes.

El que se hayan descrito distintas maneras de paso de la forma «L» grande a la forma normal, es posible que dependa del tipo de bacteria y del medio de cultivo en que se realiza la evolución.

RELACIONES ENTRE FORMAS «L» Y PROTOPLASTOS, FORMAS DE INVOLUCION Y P. P. L. O.

a) *Protoplastos.*

Según la mayor parte de los autores, la definición de protoplasto es la parte de la célula que se encuentra dentro de la pared celular, y

(*) Las formas «L» producidas por el *Pseudomonas aeruginosa* tienen gran inestabilidad osmótica, y en las fotografías de estas formas con el microscopio electrónico no se observa membrana. Moreno San Martín: Tesis doctoral, sin publicar.)

sería empleado también para designar una célula bacteriana que ha perdido su pared-celular rígida.

La forma y obtención de los protoplastos es, a primera vista, tan semejante a la de las formas «L» que se confunden, y algunas veces no se sabe si un investigador, cuando habla de protoplastos, en realidad con lo que está trabajando es con formas «L», y viceversa.

Los protoplastos se obtienen de dos maneras principales: por plasmolisis y por un tratamiento controlado con lisozima en un medio estabilizador de la presión osmótica. Recientemente, Jeynes, 1957, los ha obtenido con glicocola, igual que las formas «L». La forma de los protoplastos es esférica, y dentro de ellos se pueden observar algunas granulaciones; su tamaño varía de 2 a 6 micras de diámetro.

Las diferencias de los protoplastos con las formas «L» parecen residir en que son mucho más susceptibles que aquéllas a Schock osmótico (aunque existan formas «L» de algunas bacterias en que pase lo mismo), posiblemente porque las formas «L» conservan restos de la pared celular hasta su lisis final. En los protoplastos no se ha seguido por microscopía electrónica el resultado de la lisis, y si libera corpúsculos viables. No se ha conseguido obtener protoplastos en medios de cultivo sólidos y muy aireados, y, por lo tanto, no se ha visto que formen colonias.

Se ha encontrado que los bacteriófagos pueden reproducirse en protoplastos una vez que el virus entra en él. En cambio, se ha visto que uno de los medios de inducir la formación de la fase «L» es por medio de un bacteriófago, y las formas «L» producidas son resistentes.

Mcquillen (1955) observó la formación de protuberancias en los protoplastos, después de varias horas de cultivo; estas protuberancias parecen indicar un proceso de división. Al mismo tiempo este autor comprobó por turbimetría el crecimiento de los protoplastos en el medio estable.

Respecto a este último punto nosotros, trabajando con las formas «L» de una bacteria Gram negativa aislada de tumores de «Crown-gall», hemos encontrado algunas formas que sugieren una división parecida en las formas «L» intermedias (fotos núms. 11, 12, 13 y 14), que creemos son las primeras observaciones de este fenómeno realizadas en formas «L». No obstante, el no haber podido seguir esta división, *in vivo*, en el microscopio de contraste de fases, nos impide afirmar que estas formas se multipliquen de esta manera.

En algún momento las formas «L» pueden llenar la definición de protoplasto; pero, aparte de ese momento morfológico (cuando pierden totalmente su pared celular), tienen un papel, una misión en la vida bacteriana, siguiendo un proceso definido, a diferencia con los protoplastos, que hasta ahora parecen ser meras modificaciones de la célula bacteriana normal.

b) *Formas de involución.*

Las formas pleomórficas anormales de las bacterias han sido consideradas como formas de involución, es decir, formas degeneradas de la bacteria normal y condenadas a su extinción. Actualmente ha quedado demostrado que las formas «L» forman parte de un ciclo vital y, por lo tanto, son generativas, aunque representen un pleomorfismo típico. Las condiciones adversas en que se originan las formas «L» hacen que muchas formas normales sean destruídas antes de alcanzar el paso a la forma «L» que la hace resistente; pero incluso de estas formas no todas llegan a una maduración y a poder completar el ciclo «L»; esto se comprueba por la cantidad de membranas vacías que se observan en las preparaciones de formas «L», aunque también puede influir en esto el tratamiento bastante brusco de las preparaciones para poderlas observar al microscopio electrónico, estas formas, que no llegan a reproducirse, naturalmente, caerían dentro del concepto de formas de involución o degeneración.

Radler y Rippel-Baldes creen que la diferencia entre formas «L» y formas de involución reside en que las primeras estarían desprovistas de membrana y las segundas no, lo cual no creemos que sea así. En general, existe bastante confusión con respecto a las formas llamadas de involución, y sería conveniente dar una definición clara de ellas de manera que sea posible caracterizarlas sin confusión con otras formas.

c) *Formas P. P. L. O. («Peripneumonia-like organisms»).*

Para terminar esta rápida revisión de las relaciones más importantes de la fase «L» con otras formas, discutiremos las de los organismos parecidos a los de la peripneumonía de los bóvidos (P. P. L. O.), que se encuentran abundantemente en las mucosas y excreciones de diversos animales y el hombre. Siendo a veces patógenos para el huésped.

Si se comparan morfológicamente las formas «L» y los organismos

P. P. L. O., se ve en seguida una gran similaridad de caracteres. Microscópicamente son casi idénticas, pues en los organismos P. P. L. O. se encuentran también formas filtrables o cuerpos elementales, formas gigantes (como «L» grandes) y formas intermedias, su aspecto al microscopio electrónico es bastante parecido, aunque existan ciertas diferencias, como crecimientos alargados y formas con abultamientos irregulares que las formas «L» no poseen.

En el aspecto macroscópico las colonias P. P. L. O. son también idénticas a las producidas por las formas «L». Nos encontramos así que, aparte de la facultad que tienen las formas «L» de reproducir la bacteria de la que provienen, en sus demás características son casi iguales ambos grupos de organismos.

La hipótesis, que creemos muy fundada, de que las formas P. P. L. O. son formas «L» fijas, es decir, que han perdido la facultad de regenerar la forma normal, ha sido mantenida por Dienes, Klienerberger-Nobel y Tulasne, y además de las semejanzas descritas está basada en la creación experimental de formas «L» fijas, es decir, que, sometidas a ciertas condiciones las formas «L» y haciendo pase tras pase de ellas en ese mismo medio, se llega a poder llevarlas a un medio normal sin que reviertan a la forma original, manteniéndose en forma «L» por años.

RESUMEN

Se describe la inducción y formación de la fase «L» formando un ciclo reproductivo típico, generalizando experimentos realizados con diferentes bacterias.

Se describen las formas principales de dicho ciclo.

Se discuten brevemente las relaciones con formas P. P. L. O., protoplastos y formas de involución.

SUMMARY

The induction and formation of the L-cycle in different bacterial species are described and a detailed description of the principal bacterial evolutional L forms is given.

Some relationships between «L» forms, P. P. L. O., protoplasts and involution forms are discussed.

BIBLIOGRAFIA

(1) DIENES, L. 1942. The significance of the large bodies and the development of «L» type of colonies in bacterial cultures. J. Bact. 44. 37-73.

(2) DIENES, L. 1946. Complex reproductive processes in bacteria. Cold Spring. Harbor Symposia on Quant. Biol. XI. 51-59.

(3) DIENES, L. 1948. The isolation of tipe «L» cultures from bacteroides with the aid of penicillin and their reversion into the usual bacilli. J. Bact. 56. 445-456.

(4) DIENES, L., et WEINBERGER, H. J. 1951. The «L» forms of bacteria. Bact. Rev. 15. 245.

(5) DIENES, L. 1953. Some new observations on «L» forms of bacteria. J. Bact. 66. 274-278.

(6) HAUDUROY, P. 1929. Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes. Masson et Cie. Editeurs, Paris. Deuxième partie: Les microbes filtrants visibles.

(7) HAUDUROY, P. 1954. Mecanisme de formation des formes filtrables et invisibles. Ann. Inst. Pasteur. 86. 395-400.

(8) KELLENBERGER, E. LIEBERMEISTER, K. UND BONIFAS, V. 1956. Studien zur «L»-form der bakterien II. Z. Naturforschg. 11b, 206-215.

(9) KLIENERBERGER, E. 1935. The natural occurrence of pleuropneumonialike organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. J. Path. Bacc. 40. 93-105.

(10) KLIENEBERGER-NOBEL. 1949. Origin development and significance of «L»-forms in bacterial cultures. J. Gen. Microbiol. 3. 434-443.

(11) KLIENEBERGER-NOBEL. 1951. Filterable forms of bacteria. Bact. Rev. 15. 77.

(12) LIEBERMEISTER, K. UND KELLENBERGER, E. 1956. Studien sur «L»-form der bakterien I. Z. Naturforschg, 11b, 200-206.

(13) LOHNIS, F., and SMITH, N. R. 1916. Life cycles of bacteria. J. Agr. Research. 6. 675-702.

(14) MCQUILLEN, K. 1956. Capabilities of bacterial protoplasts. Bact. Anat. 6º Symp. Soc. Gen. Microbiol.

(15) MEDILL, M. A., and HUTCHINSON, W. G. 1954. The reversion of the «L» form of *Proteus mirabilis* into the rod form. J. Bact. 68. 89-92.

(16) RUBIO HUERTOS, M., y MORENO SAN MARTÍN, R. 1953. Obtención y estudio de las formas filtrables de *Proteus vulgaris*. Microbiol. Esp. 6. 195.

(17) RUBIO HUERTOS, M. 1954. Las formas filtrables y ciclo «L» de las bacterias como mecanismo de resistencia a los antibióticos. Medicamenta, 104, 207.

(18) RUBIO HUERTOS, M. 1955. Estudio del ciclo «L» y formas filtrables de las bacterias. Public. del C. S. I. C.

(19) RUBIO HUERTOS, M.; KUSTER, E., y FLAIG, W. 1955. Lich und electronenmikrokopische untersuchungen an «L»-formen bei *Pseudomonas fluorescens. B proteus* und *Rhizobium*. Zenbt. für bak. orig. 162.

(20) RUBIO HUERTOS, M., y DESJARDINS, P. L. 1956. Microscopia electrónica de las formas «L» y filtrables del *Agrobacterium tumefaciens*. Microbiol. Esp. 9. 4. 375.

(21) SMITH, W. E.; HILLIER, J., et MUDD, S. 1948. Electron micrograph studies of two strains of P. P. L. O. of human derivation. J. Bact. 56. 589.

(22) STEMPEN, H., et HUTCHINSON, W. C. 1951. The formation and development of large bodies in *Proteus* CX. 19. J. Bact. 61. 231.

(23) TULASNE, R. 1941. Existence of «L» forms in common bacteria and their possible importance. Nature (London). 164. 876.

(24) TULASNE, R., et BRINGMANN, G. 1952. Données nouvelles apportées par la microscopie electronique sur la morphologie des formes «L» des bactéries. Revue d'Inmmunologie, 16. 325.

(25) TULASNE, R. 1953. Symposium citologia batterica. 6.º Congreso Internacional de Microbiología. Roma.

(26) VICENTE JORDANA, R. 1957. Acerca de la existencia de un sistema de defensa celular durante la base de crecimiento: Citoarjesis. Anal. Edaf. 16. 387-456.

(27) VILAS, L.; TEJERINA, G., y RUBIO, M. 1954. Presence de bacteries du sol sous leur forme «L» et leur forme filtrable. Actes et Comp. Rend. V. Congr. Inter. Science du Sol. Leopoldville.

(28) WEIBULL, C. 1956. Bacterial Protoplasts; their formation and characteristics. Bact. Anat. 6º. Symp. Soc. Gen. Microbiol.

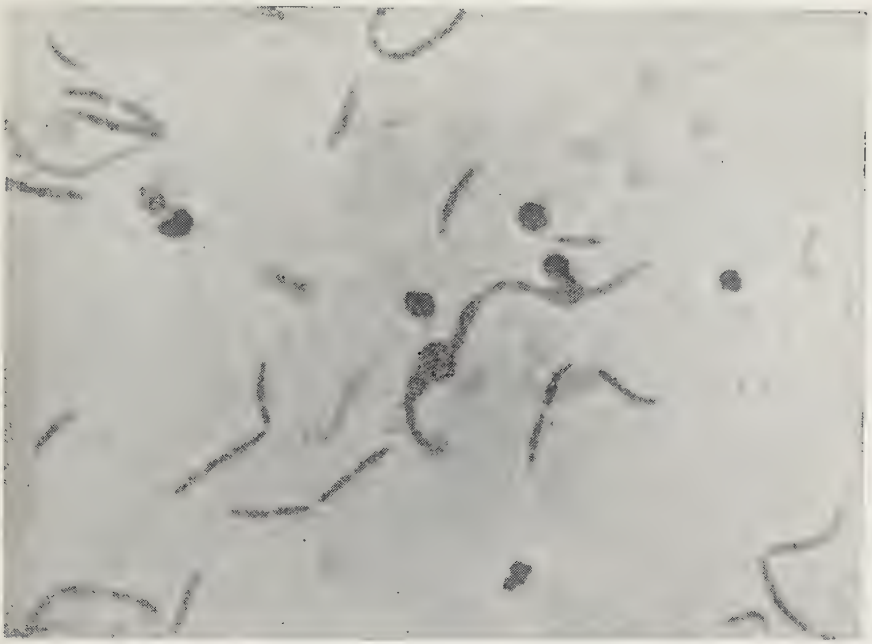


Foto 1.

Pseudomonas florescens. Formación de hinchamientos y, subsecuentemente, de formas «L» intermedias. Microscopio normal. Fuschina fenicada. X 2.000.

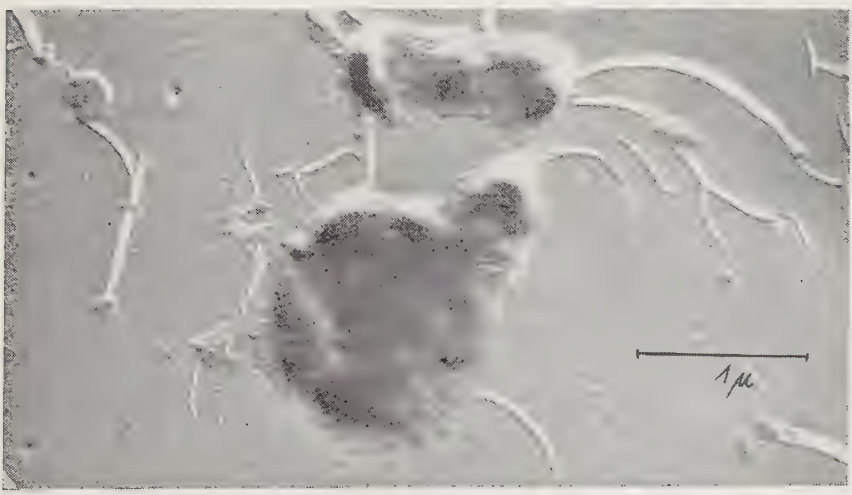


Foto 2.

Ps. fluorescens. Formación de cuerpo «L» a partir de un bacilo. Microscopio electrónico. X 21.000.

Foto 3.

Ps. fluorescens. Formación de un cuerpo «L» a partir de dos formas bacilares. Microscopio electrónico.
X 21.000.

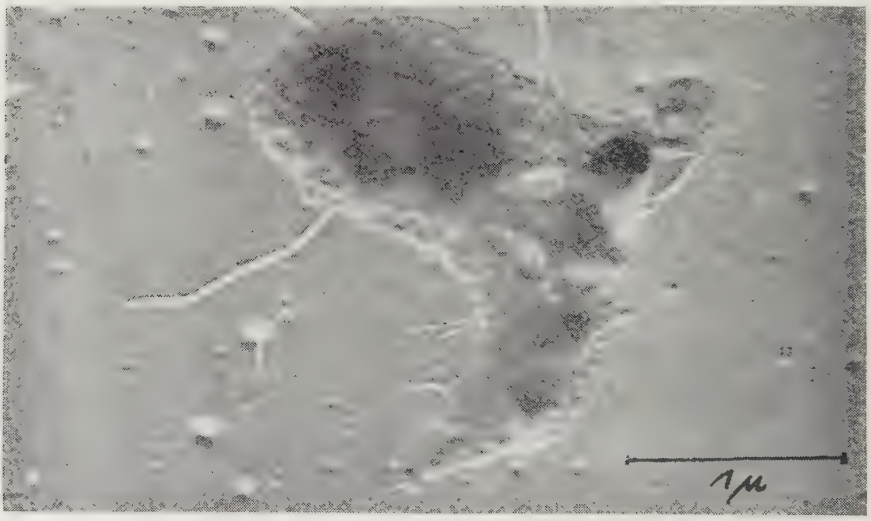


Foto 4.

Ps. fluorescens. Formación lateral de un cuerpo «L».
X 20.000.

Foto 5.

Bacteria G. En el centro una forma intermedia con flagelos. En la parte inferior izquierda, una forma en la que se puede apreciar la formación de un nuevo bacilo. También se pueden apreciar algunas formas filtrables diseminadas por la preparación. Microscopio electrónico.
X 16.000.

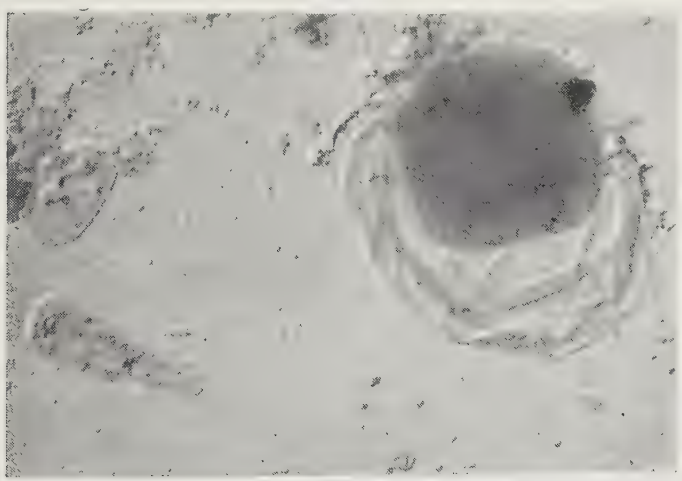


Foto 6.

Bacteria G. Forma «L» intermedia en la que se puede apreciar cómo el protoplasto se sale de la membrana. El punto pequeño oscuro corresponde al llamado punto de crecimiento. Microscopio electrónico.
X 18.000.

Foto 7.

Ps. fluorescens. Forma «L» intermedia con flagelos en la que se puede apreciar la división de la masa interna. Microscopio electrónico.
X 27.000.

Foto 8.

Agrobacterium tumefaciens. Forma «L» grande: su parte central se ha dividido en pequeños gránulos y la membrana se ha hecho más fina. Microscopio electrónico.
X 21.000.

Foto 9.

Bactedia G. Forma «L» grande. Los gránulos se disponen alrededor de una vacuola central. Microscopio electrónico.
X 21.000.

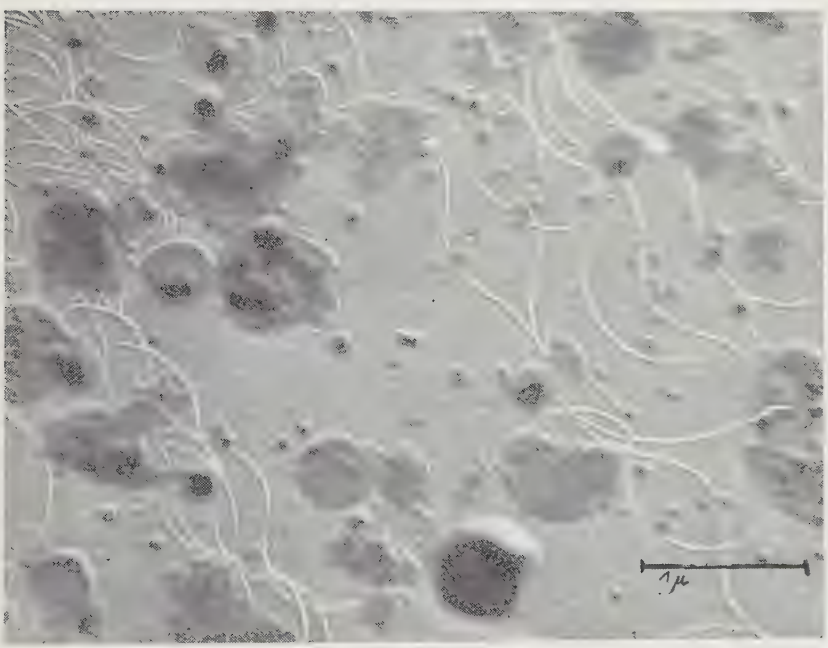


Foto 10.

Ps. fluorenscens. Formas filtrables y restos de flagelos. Algunas de las formas están en crecimiento. Microscopio electrónico.
X 21.000.

Fotos 11 y 12

Agrobacterium tumefaciens. Formas «L» con estrangulamientos. Microscopio electrónico.
X 21.000.

FOTOS 13 Y 14.

A. tumefaciens. Formas «L» con estrangulamiento siguiendo un proceso de división. Microscopio electrónico.

Todas las fotografías obtenidas con el microscopio electrónico han sido sombreadas con paladio, excepto la 11 y la 12.

DIRECCION GENERAL DE AGRICULTURA
INSTITUTO DE BIOLOGIA DEL TABACO. SEVILLA (HELIÓPOLIS)

LA FLORA BACTERIANA DEL TABACO

POR

ANTONIO IZQUIERDDO TAMAYO

La planta de tabaco, una vez terminado su ciclo vegetativo en el campo, es recolectada y colgada en locales apropiados («secaderos»), donde se deseca, constituyendo lo que se llama tabaco seco o curado; pero esta planta no sería utilizable para la industria ni constituiría el «tabaco comercial fumable» si no fuese sometida a la serie de operaciones que se denominan con el término más o menos impreciso de «fermentación». Durante este proceso, el más importante de cuantos se verifican en la industrialización del tabaco, el tabaco curado sufre una serie de transformaciones químicas, mediante las cuales, y en virtud del calor y pérdida de peso, se obtiene el producto comercial (2).

Los tabacos españoles se fermentan por el procedimiento denominado en masas o pilones, y también tipo «cubano». Consiste en la formación de pilones de 5.000 a 15.000 kilos de tabaco, con humedad variable, pero en general escasa, que no suele pasar del 20 por 100; la temperatura sube de manera progresiva, que se interrumpe varias veces, deshaciendo la masa y rehaciéndola, alterando la posición relativa de las distintas partes. A veces, la temperatura alcanza los 60° y 70°. En los diez-doce primeros días sube de la temperatura ambiente (unos 20°) hasta 55° o más; entonces se hace un cambio, después del cual el pilón alcanza las mismas temperaturas, pero en doble espacio de tiempo.

Desde hace largo tiempo se debaten dos teorías la explicación de los fenómenos que se realizan durante la fermentación: la enzimática y la microbiana (véase 2 y 9). La teoría microbiana ha estado sostenida, fundamentalmente, por los trabajos de Reid, Mckinstry y Haley, de la Universidad de Pensylvania (U. S. A.) (11), y por los de Giovannozzi (4-5 y 6) en el Instituto Experimental de Scafati, así como por los de

Jensen y Parmele (10). En España las primeras investigaciones acerca de la microbiología del tabaco se deben a Alcaraz y Beneyto (1); después han estudiado la cuestión Izquierdo Tamayo y González Cancho (1-8 y 9). En la actualidad tiende a superarse el exclusivismo de tales teorías, ya que pueden intervenir tanto los microorganismos como los enzimas, según las circunstancias.

La fermentación del tabaco es un proceso extraordinariamente complejo, en el cual colaboran una serie de factores muy variados, los que influyen en la serie de transformaciones que convierten el tabaco seco o curado en «tabaco fermentado». Existen, por una parte, las transformaciones naturales que todo producto vegetal seco experimenta y en las que puede haber una intensa colaboración de enzimas; este proceso bioquímico es mal conocido en sus detalles. Por otra parte, al producirse humedad y temperatura en los montones de tabaco, se da un ambiente favorable para el desarrollo de múltiples microorganismos; de éstos, algunos (mohos) pueden ocasionar perturbaciones perjudiciales en el producto, comunicándole olores y sabores desagradables; otros, como las bacterias, parece que en muchos casos pueden ser factores importantes y positivos de ciertas transformaciones, produciendo aroma y características útiles. Todos los factores mencionados quedan, además, poderosamente influídos por las circunstancias del ambiente (aire-temperatura-humedad).

A. Frey Wyssling (3) nos ofrece ideas muy claras sobre el conjunto del proceso curado-fermentación. Este autor distingue tres fenómenos diferentes en el proceso:

1.° La *autolisis*, debida a la actividad de las propias enzimas de la hoja. La actuación de las desmolasas se lleva a cabo aun sin el auxilio de agua, y produce una destrucción de materia orgánica, y como productos finales anhídrido carbónico, que es liberado, e hidrógeno; éste sigue una suerte distinta, según un camino aerobio o anaerobio. En aerobiosis es fijado, mediante fermentos especiales, al oxígeno activado («aceptor»), liberándose agua y calor (respiración). En anaerobiosis, los «aceptores» son los propios productos de las descomposiciones moleculares que sufren una reducción al aceptar el hidrógeno liberado. Todos estos fenómenos también tienen lugar en las hojas secas, manifestándose la fermentación tan sólo cuando se amontonan las hojas. En cuanto falta el agua, indispensable para su actividad, se paralizan las hidrolasas, manteniendo en cambio su acción las desmolasas. Al amontonar las ho-

jas, el agua que se forma no puede evaporarse, obstaculizándose igualmente la irradiación de calor; al aumentar la humedad por trasudación de la masa foliar, inician sus funciones las hidrolasas, descomponiendo varios polisacáridos en monosacáridos, los polipéptidos en aminoácidos y los diversos glucósidos en sus azúcares y agluconas. Este proceso es de un interés particular, ya que muchas sustancias odorantes y aromáticas se encuentran en las hojas en forma de glucósidos no volatilizables; tan sólo como consecuencia de la fermentación pueden liberarse y ser percibidos por nuestros sentidos.

2.° *Fermentación microbiana.*—Como consecuencia de los fenómenos anteriores, se obtiene un medio adecuado para el desarrollo de los microorganismos, con agua y diversas sustancias disueltas (azúcares y compuestos nitrogenados). En este momento se produce la fermentación microbiana, a veces muy intensa. La hipótesis bacteriana encuentra siempre el obstáculo de la escasa humedad del tabaco (18 por 100), ya que para el desarrollo óptimo de bacterias se precisan humedades, por lo menos, de 28 por 100 para arriba.

3.° *Autooxidación.*—A temperaturas superiores a los 80°, los enzimas y los microbios son destruídos; esto no obstante, las hojas continúan absorbiendo oxígeno, tanto más cuanto más elevada es la temperatura, lo que se debe a una autooxidación de combinaciones químicas lábiles, que se forman a altas temperaturas (por ejemplo, fructosa). Este fenómeno juega un papel importante en la fermentación de tabacos expuestos a altas temperaturas, y da como resultado un oscurecimiento de los mismos.

I. VARIACIONES CUANTITATIVAS DE LA POBLACION MICROBIANA EN LOS PILONES DE TABACO

El procedimiento empleado por nosotros se basa, principalmente, en los trabajos de Giovannozzi (5). Un gramo de tabaco es picado y machacado con 100 c. c. de agua estéril; así se obtiene una dilución 1:100, a partir de la cual se hacen todas las demás. Las diluciones empleadas oscilan entre 1:100 hasta 1:1.000.000, sembrándose, en fin, en las placas un centímetro cúbico de la dilución conveniente. El medio empleado ha sido casi siempre el agar común al extracto de carne, ajustado a

un pH neutro. En algunos casos, no obstante, hemos empleado la infusión de tabaco peptonada y glucosada, solidificada con agar-agar.

La toma de muestras se ha realizado en el Centro de Fermentación de Santiponce (hoy en La Rinconada), a lo largo de todo el proceso, o sea primeramente de tabaco curado o seco y después en distintos intervalos de temperatura.

El número de muestras analizadas y en las que se han verificado recuentos es de 54.

A continuación ofrecemos un cuadro con los resultados, resumidos, de los recuentos efectuados.

CUADRO I

DESARROLLO DE MICROORGANISMOS EN LOS PILONES DE TABACO

	Temperatura	Humedad	Microorganismos por gramo Bacterias	Mohos
Campaña 1949-50.				
Tabaco curado	—	—	600.000	150.000
» »	—	—	500.000	6.000.000
» »	—	—	400.000	—
Tabaco fermentado	33º	—	460.000	—
» »	42º	—	400.000	—
» »	44º	—	500.000	—
» »	66º	—	40.000	—
» »	70º	—	40.000	—
» »	71º	—	24.000	—
Campaña 1951-52.				
Tabaco curado	—	12,93 %	586.666	400.000
Tabaco fermentado	35º	13,67 %	210.000	10.000
» »	47º	17,5 %	252,000	—
» »	69º	15,64 %	59.000	—
» »	71º	17,41 %	10.000	—
Segunda fase del pilón (después de un cambio). En la iniciación:				
	—	17,5 %	11.000	—
Tabaco fermentado	44º	16,6 %	4.000	—
» »	51º	16,6 %	3.000	—
» »	53º	16,6 %	7.000	—
Campaña 1953-54.				
Tabaco curado	—	18 %	127.000	30.000
Fermentado (C)	36º	18,5 %	1.240.000	21.000
» (C)	45º	18,5 %	53.650	—
» (P)	47º	18,8 %	111.880	—
» (C)	56º	17,7 %	18.150	—
» (P)	46º	17,6 %	68.300	—
» (P)	45º	17,6 %	17.000	—
» (C)	58º	18 %	80.600	—
Segunda fase del pilón (después de un cambio). En la iniciación:				
	—	19,5 %	2.500	—
Fermentado	57º	19,7 %	8.500	—
»	60º	15,8 %	100	—

NOTA.—La C significa muestra tomada del centro del pilón. La P. muestra tomada de la periferia del mismo.

De la observación del cuadro anterior pueden hacerse las siguientes deducciones:

1.ª En la campaña 1949-50 se registra un aumento de la población microbiana a los 33° y otro a los 44°. Existen, por consiguiente, dos períodos de multiplicación. A partir de los 44° el número de microorganismos disminuye ininterrumpidamente. (Véase la gráfica I.)

2.ª En la campaña 1951-52 se registra un descenso notable a los 35°. Hay que tener en cuenta que en 1949-50 el aumento tuvo lugar un poco antes, a los 33°. La primera muestra fué tomada a los cinco días; por esta razón no podemos saber si, en días anteriores, tuvo lugar la fase de multiplicación. De unos pilones a otros es natural que existan diferencias en lo que concierne a la rapidez con que alcanzan determinada temperatura; por otra parte, no puede pensarse en un momento y temperatura exacta en la que exista multiplicación de bacterias, puesto que todo ello está sometido a los límites naturales de la variabilidad. En cambio, sí se registra, en esta campaña, el segundo aumento, análogo al de 1949-50, a los 47°. (Véase la gráfica II.)

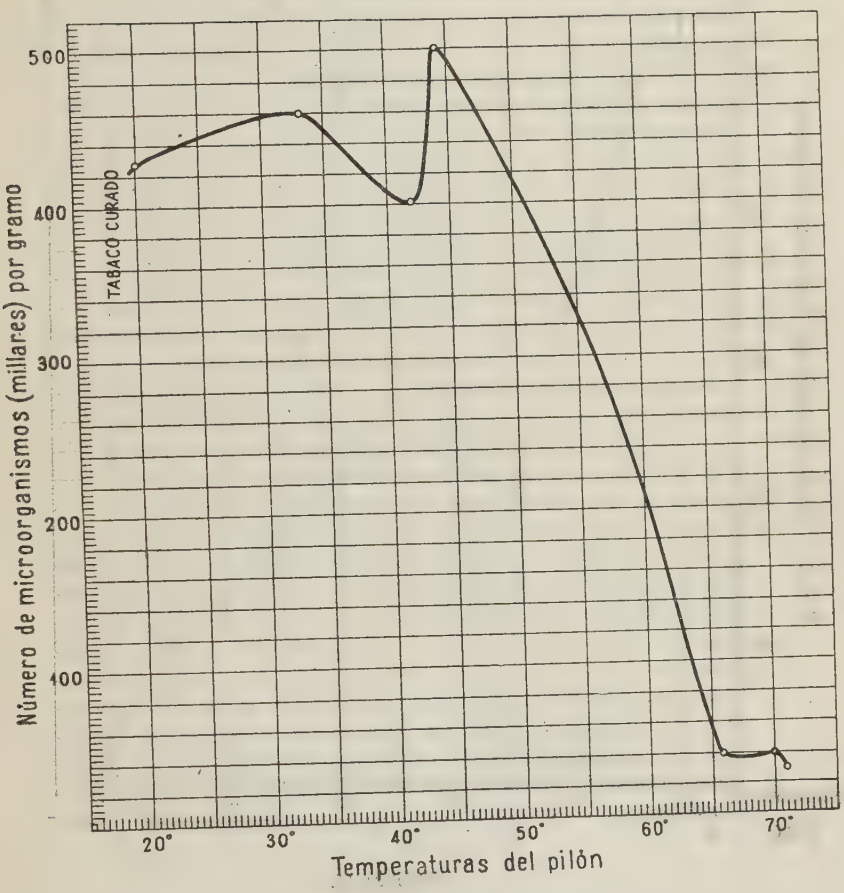
3.ª En la campaña 1953-54, el aumento del número de bacterias es notable al alcanzar los 36°, que tiene lugar en los cinco primeros días; después el número disminuye sin interrupción (véase la gráfica III). Desde los doce días no fué tomada ninguna muestra hasta los veinticuatro días, sin que podamos saber, por tanto, si durante este período hubo alguna segunda fase de multiplicación análoga a la ya registrada en los años anteriores. Un hecho digno de notar, en esta campaña, es que en las muestras tomadas en la periferia de la masa la disminución del número de microorganismos es menor que en las tomadas del centro de la misma.

4.ª En los pilones de tabaco en fermentación existen por consiguiente, en líneas generales, dos períodos de multiplicación de microorganismos y, por tanto, de posible actividad microbiana. Aunque se registra una gran variabilidad de unos pilones a otros, el primer incremento tiene lugar entre los 33°-36° y el segundo entre los 44°-47°, siendo siempre mayor el primero que el segundo. Unos pilones suben más rápidamente que otros, y, por tanto, la fecha en que alcanzan el primer máximo es variable, aunque casi siempre tiene lugar durante los cinco primeros días. A partir de los 50° el número de bacterias disminuye considerablemente.

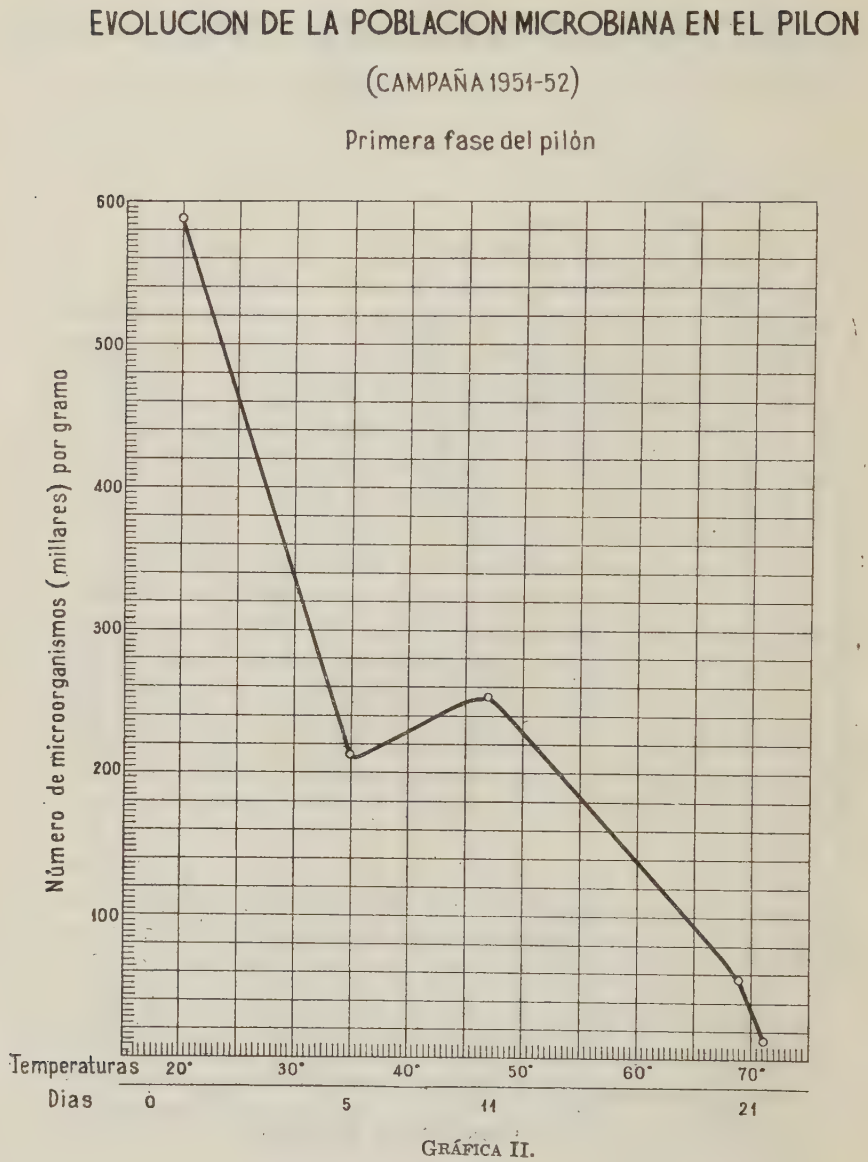
5.ª Se puede suponer la existencia, en el tabaco, de dos tipos o gru-

EVOLUCION DE LA POBLACION MICROBIANA EN EL PILON

(CAMPAÑA 1949-50)



GRÁFICA I.

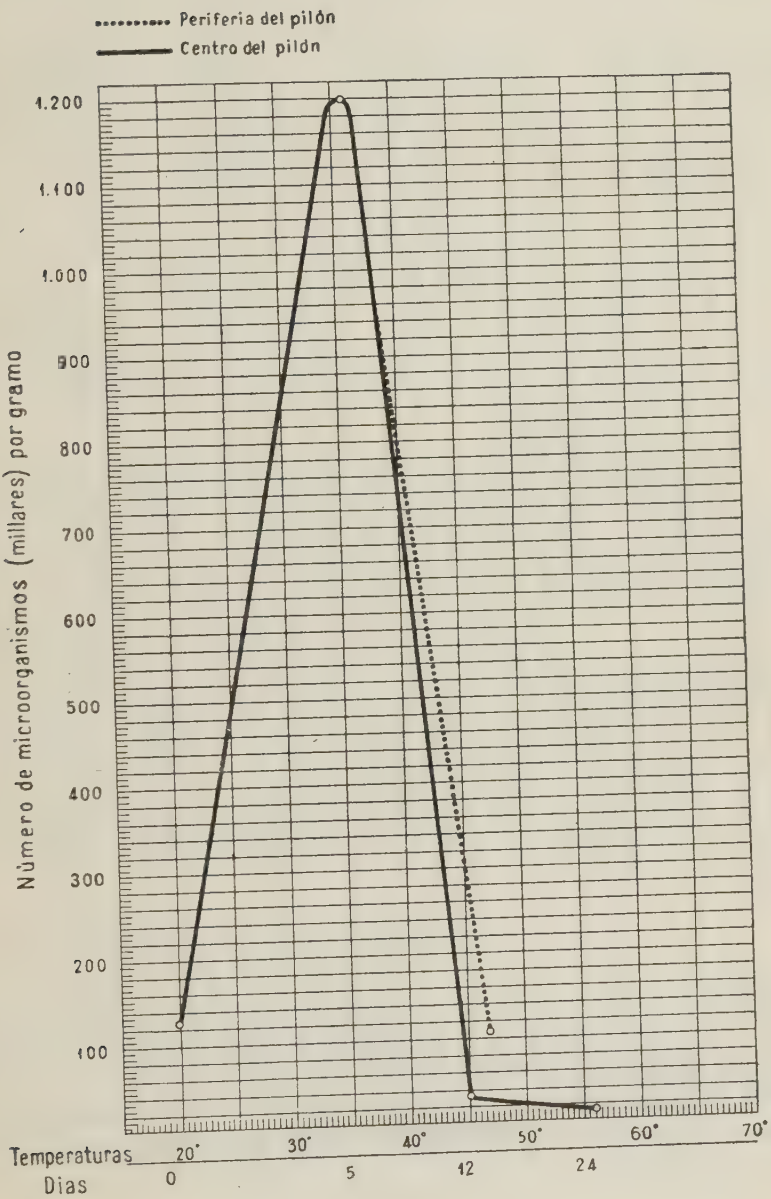

EVOLUCION DE LA POBLACION MICROBIANA EN EL PILON
(CAMPAÑA 1951-52)
Primera fase del pilón
Número de microorganismos (millares) por gramo
600
500
400
300
200
100
Temperaturas
20°
30°
40°
50°
60°
70°
Dias
0
5
11
21

GRÁFICA II.

EVOLUCION DE LA POBLACION MICROBIANA EN EL PILON

(CAMPAÑA 1953-54)

Primera fase del pilón



GRÁFICA III.

pos de bacterias: unas, que encuentran su óptimo de multiplicación a los 33°-36°, y otras, que lo tienen a los 44°-47°.

6.ª En la segunda fase del pilón, después de un cambio, hay una disminución inicial, seguida de un aumento del número de microorganismos a los 53°-57°. Después, el número disminuye y decae grandemente.

7.ª Existe una relación entre el aumento de bacterias y el aumento de la humedad. En la campaña 1951-52 (véase el Cuadro II) puede verse esto; así, el aumento de microorganismos que tiene lugar a los 47° coincide con un aumento del grado de humedad, que del 13,67 por 100 pasa al 17,5 por 100. En 1953-54 la humedad en los cinco primeros días se mantiene estacionaria, con un ligero aumento (de 18 por 100 a 18,5 por 100); el único factor de multiplicación ha sido aquí, por tanto, la temperatura. Después la humedad disminuye poco, pero la temperatura aumenta y el número de bacterias decae por consiguiente. La multiplicación de bacterias coincide siempre con aumento o al menos estabilización de humedad; cuando ésta disminuye nunca hay aumento en el número de microorganismos.

8.ª Los mohos desaparecen con el aumento de temperatura.

9.ª Los números de microorganismos encontrados por nosotros son muy pequeños, en comparación con los que ofrecen otros autores; pero también son más bajas las cifras de humedad, que, como puede verse en el Cuadro I, oscilan entre el 17-20 por 100 con un mínimo del 12 por 100. En Italia, Giovannozzi (4) encuentra cifras de humedad de 25-30 por 100 con una media de 23.000.000 de microorganismos por centímetro cúbico en el tabaco curado, que sube al fermentar a 860.000.000. Reid Mckinstry y Haley (11), en Pensylvania, registran números de 2.000 y 1.000 millones por centímetro cúbico con humedades del 40 por 100. Jensen y Parmele (10), con cifras de humedad del 30 al 40 por 100, encuentran números de microorganismos de hasta 110.000.000 por centímetro cúbico.

II. FLORA BACTERIANA DEL TABACO

Dejando aparte los numerosos mohos aislados (*Aspergillus* y *Penicillium*, principalmente), así como algunos *Streptomyces*, los microorganismos del tabaco son, principalmente, *Bacillus* y *Micrococcus*. (Véase la última edición del Bergey, 1948.)

Los procedimientos de identificación han sido, principalmente, los

indicados en el «Manual of Methods for pure Culture Study of Bacteria» (publicado por «The Committee on Bacteriological Technic of the Society of American Bacteriologists», Géneve, N. Y.); pueden verse, también, resumidos en la memoria de Izquierdo Tamayo (9).

Género *Bacillus* (familia Baciláceas).—Bacilos esporógenos (formadores de espora resistente), aerobios, casi siempre Gram-positivos. Hemos aislado 97 cepas de este tipo de bacterias, que pueden agruparse en dos secciones, de acuerdo con Smith, Gordon y Clark (12). Las distintas especies o agrupaciones específicas encontradas pueden diferenciarse de acuerdo con la siguiente clave:

Clave para diferenciar los bacilos del tabaco.

1. Diámetro del bacilo vegetativo menor de 0,9 micras.
   - *a)* Desarrollo a pH 6. Producen acetil-metil-carbinol.
   - *b)* Gelatina hidrolizada (método de Frazier). Acido formado de arabinosa o xilosa en medio con nitrógeno amoniacal.
     - *c)* Almidón hidrolizado. Nitratos reducido a nitritos ... ... *Bacillus Subtilis.*
     - *cc)* Almidón no hidrolizado. Nitratos no reducidos ... ... *Bacillus Pumilus.*
   - *bb)* Gelatina no hidrolizada. No produce ácido de xilosa y arabinosa en medio con nitrógeno amoniacal ... ... *Bacillus coagulans.*

2. Diámetro del bacilo vegetativo 0,9 micras o más.
   - *a)* Produce ácido de xilosa y arabinosa en medio con nitrógeno amoniacal. No produce acetil-metil-carbinol ... ... *Bacillus Megatherium.*
   - *aa)* No produce ácido de xilosa y arabinosa en medio con nitrógeno amoniacal. Produce acetil-metil-carbinol.
     - *c)* Desarrollo en agar no rizoide ... *Bacillus Cereus.*
     - *cc)* Desarrollo en agar rizoide ... ... *B. Cereus* var. *Mycoides.*

Queremos llamar la atención sobre el hecho de la abundancia con que se encuentran, en el tabaco, bacilos que no pueden clasificarse con

seguridad en ninguna de las especies admitidas. Se trata de formas que presentan, mezclados, caracteres de varias de ellas; son formas de transición, intermedias o resultado de adaptaciones especiales (con formación de los correspondientes enzimas de adaptación). Hemos aislado 97 cepas de *Bacillus*, de las cuales 50 son intermedias. Se distribuyen así:

Bacillus Subtilis	25 cepas
Bacillus Pumilus	11 cepas
Bacillus Megatherium	1 cepa
Bacillus Cereus	4 cepas
Bacillus Mycoides	8 cepas
Bacillus Subtilis-Pumilus (intermedia)	10 cepas
Bacillus Subtilis-Coagulans	3 cepas
Bacillus Megatherium-Cereus	35 cepas

Bacillus Subtilis Cohn, emend. Prazmowski.

Diagnosis.—Bacilo esporógeno cuyo diámetro de la forma vegetativa es menor de 0,9 micras; Gram-positivo, aunque algunas cepas pueden ser Gram-variables; su longitud más frecuente son 1,8 — 2,5 micras (Lámina V, figs. 17 y 18. Casi siempre móvil. Espora elíptica, central o subterminal, sin deformar el cuerpo del bacilo (fig. 18, Lám. V). Se desarrolla en caldo a pH 6. Produce acetil-metil-carbinol. Hidroliza la gelatina. Produce ácido de xilosa y arabinosa en medio con N. amonacal. Hidroliza el almidón. Reduce los nitratos a nitritos. Utiliza los citratos. No produce indol ni SH_2. Coagula y acidifica la leche tornasolada y digiere la caseína. Todas las cepas han fermentado la glucosa, sacarosa, levulosa, maltosa y manita; ninguna ha fermentado la lactosa; algunas han fermentado la galactosa. Ninguna cepa ha producido gases en la fermentación de carbohidratos; sólo ácido.

Las *colonias en agar* del *B. Subtilis*, aunque muy polimorfas, responden, en general, a unos cuantos tipos. Unas son pequeñas, superficiales, de unos 5 mm. de diámetro, brillantes, estrelladas, de color blanco, con las terminaciones de las ramificaciones lobuladas, las cuales se hunden algo en el medio (Lámina III, fig. 9 A); otras veces son algo ovaladas, poco levantadas sobre el medio, con la superficie finamente rugosa y los bordes algo dentados, con finas ramificaciones, color amari-

llo y cremoso, de unos 7-8 mm. (Lámina IV, fig. 12 A.) Otro tipo corresponde a colonias extendidas, que ocupan a veces casi toda la superficie de la placa; puede tener forma irregular o algo ameboide, color blanco sucio o parduzco y algunas ramificaciones lobuladas (Lámina II, figura 5 A) que se extienden más o menos; pueden ser grandes 3-4 cm.), superficiales, blancas, con abundantes ramificaciones que parten de un círculo central pequeño y que terminan en extremos ensanchados y lobulados o en finas ramificaciones que se extienden (Lámina III, fig. 10); la superficie suele ser lisa y brillante.

En caldo suelen formar una película o velo consistente, rugoso o liso, frágil, que trepa por las paredes del tubo; el caldo queda completamente transparente. (Lámina V, fig. 15 A.)

Bacillus Pumilus Gottheil.

Diagnosis.—Bacilo esporógeno cuyo diámetro de la forma vegetativa es menor de 0,9 micras; Gram-positivo, aunque algunas cepas pueden ser Gram-variables; longitud del bacilo, 1,4 — 2,3 micras; casi siempre muy móvil. Espora elíptica, central o subterminal, sin deformar el cuerpo del bacilo. Se desarrolla en caldo a pH 6; produce acetil-metil-carbinol; hidroliza la gelatina. Produce ácido de xilosa y arabinosa en medio con nitrógeno amoniacal. No hidroliza el almidón. No reduce los nitratos. Utiliza los citratos. No produce indol ni SH_2. Coagula y acidifica la leche tornasolada y digiere la caseína. Todas las cepas han fermentado, produciendo ácido, pero no gas, la glucosa, levulosa, sacarosa y manita; ninguna ha fermentado la lactosa, ni la galactosa ni la maltosa. Las afinidades de esta especie con *B. Subtilis* son evidentes; se distingue claramente por no hidrolizar el almidón ni reducir los nitratos; existen, no obstante, formas intermedias. Los antiguos *B. Mesentericus* y *B. Vulgatus* pueden considerarse como meras variantes, respectivamente, del *B. Pumilus* y del *B. Subtilis.* (Véase 9.)

Las *colonias en agar* responden, frecuentemente, a un tipo muy característico; son superficiales, blancas, brillantes, con una porción central circular, de la que parten numerosas ramificaciones dendríticas con extremos lobulados; el aspecto del conjunto es el de un sol esquemático (Lámina I, fig. 2 A; Lámina III, fig. 7); este tipo de colonia, a veces, se extiende totalmente o por medio de algunas ramificaciones (Lámina II,

figura 4 A). También forma colonias pequeñas de 1,5 — 2 mm., circulares, algo levantadas sobre el medio, blancas, de superficie y bordes lisos (Lámina I, fig. 3 B; Lámina II, fig. 5 B; Lámina IV, fig. 12 D).

En caldo el desarrollo tiene características análogas al de *B. Subtilis.*

Bacillus Megatherium De Bary.

Diagnosis. Bacilo esporógeno; diámetro de la forma vegetativa, 0,9 micras o más; Gram-positivo, aunque algunos se colorean de manera irregular; longitud del bacilo, 2,1 — 2,4 micras; móvil; espora elíptica, central o subterminal, sin deformar el cuerpo del bacilo. Se desarrolla en caldo a pH 6; no produce acetil-metil-carbinol. Hidroliza la gelatina. Produce ácido de xilosa y arabinosa en medio con nitrógeno amoniacal. Hidroliza el almidón. Reduce los nitratos a nitritos. Utiliza los citratos. No produce indol ni SH_2. Coagula y acidifica la leche tornasolada y digiere el coágulo. Fermenta, con producción de ácido, pero no de gas, la glucosa, levolusa, sacarosa y manita. No fermenta la lactosa, galactosa ni maltosa.

Las *colonias en agar* suelen ser redondas, de consistencia algo mucosa, de unos 5 mm., con un reborde de color blanco-sucio.

En caldo se desarrolla formando un velo o película lisa, que sube por las paredes del tubo; el caldo queda transparente.

Bacillus Cereus Frankland and Frankland.

Diagnosis.—Bacilo esporógeno; diámetro de la forma vegetativa, 0,9 micras o más (1 — 1,3 y hasta 1,6 micras); Gram-positivo, formando largas cedenas estreptobacilares (Lámina V, fig. 16); longitud, 1,7 a 2,8 micras; bacilo ovalado con extremos claramente redondeados; móvil, aunque algunas cepas carecen le esta particularidad; espora elíptica, central, sin deformar el cuerpo del bacilo. No suele desarrollarse en caldo a pH 6. Produce acetil-metil-carbinol. Hidroliza la gelatina. No produce ácido de xilosa y arabinosa en medio con nitrógeno amoniacal. Hidroliza el almidón. Reduce los nitratos a nitritos. Unas cepas utilizan los citratos, otras no. No produce indol ni SH_2. Sobre la leche tornasolada la acción es variable, llegando en alguna cepa a alcalinizarla y producir

putrefacción. Suele fermentar con producción de ácido, pero no de gas, la glucosa, levulosa, sacarosa, maltosa, manita; no fermenta la lactosa ni la galactosa; alguna cepa sólo la glucosa.

Las *colonias en agar* son circulares, blancas, poco levantadas sobre el medio, de aspecto céreo; de unos 7 mm. de diámetro, con un reborde y superficie mate.

En caldo, suele formar película o velo, pero otras cepas dejan sedimento pulverulento, enturbiando ligeramente el medio.

Bacillus Mycoides Flugge.

En realidad se trata de una variedad de *B. Cereus* con quien coincide en todos sus caracteres. Se diferencia por su desarrollo en medios sólidos, en los que forma largos filamentos rizoides (aspecto de raicillas), que se extienden por la superficie del medio, recurvándose y entrelazándose como el micelio de un moho u hongo (de ahí el nombre específico).

Las *colonias en agar* son, por lo común, muy características; extendidas, de color grisáceo, poco levantadas sobre el medio; extendiéndose por toda la superficie de la placa mediante ramificaciones que forman largas hebras, como raicillas o micelios, constituyendo una verdadera maraña (Lámina II, fig. 5 C); color blanco-grisáceo y superficie finamente granulosa. Forman, con frecuencia, núcleos más densos y de mayor consistencia, de los cuales parten una serie de ramificaciones divergentes y entrelazadas (Lámina II, fig. 6).

B. Subtilis-Pumilus (Intermedio).

Diez cepas entran en esta agrupación, de las cuales una *no* ha hidrolizado el almidón (carácter de *B. Pumilus),* pero ha reducido los nitratos (carácter de *B. Subtilis);* todos los demás caracteres coinciden más con *B. Subtilis,* y lo mismo ocurre a las otras nueve cepas; lo que nos induce a considerarlas como intermedias es el hecho de que ninguna ha reducido los nitratos.

Morfológicamente son, con frecuencia, diplo-bacilos, y se colorean irregularmente por el Gram, es decir, son Gram-variables; los bacilos suelen formar agrupaciones paralelas.

Las *colonias en agar* recuerdan quizá más al tipo de *Pumilus;* blancas, con una zona central circular, de la que parten ramificaciones estrelladas, lobuladas (Lámina II, fig. 5 D); un tipo relacionado con éste es el de la figura 11 de la Lámina III, en el que las ramificaciones que parten de la zona central circular se unen y constituyen una zona estriada de bordes dentados. Existen también colonias circulares, algo levantadas o convexas, de superficie y bordes lisos (Lámina II, fig. 4 E).

B. Subtilis-Coagulans (Intermedios).

Tres de nuestras cepas *no* han licuado la gelatina, carácter que nos llevaría al *B. Coagulans;* pero como quiera que esta especie no fermenta ni la arabinosa ni la xilosa y nuestras tres cepas lo han hecho, es por lo que las consideramos intermedias. Igualmente, el *B. Coagulans* no utiliza los citratos como fuente de carbono, y nuestras tres cepas lo han utilizado (carácter de *Subtilis);* otra serie de caracteres los acercan también a *Subtilis.* Destaquemos que, salvo una cepa, las otras dos se han aislado de tabacos que alcanzaron altas temperaturas, lo que está de acuerdo con el carácter más termófilo que suele tener *B. Coagulans,* que puede desarrollarse hasta 60º.

B. Megatherium Cereus (Intermedio).

El grupo más numeroso de cepas aisladas del tabaco (35) corresponde a esta agrupación.

El hecho principal que nos induce a considerarlas como intermedias es que todas han fermentado, produciendo ácido, la xilosa y arabinosa en medio con nitrógeno amoniacal (carácter de *B. Megatherium),* pero, en cambio, todas han producido acetil-metil-carbinol (carácter de *B. Cereus).*

Las *colonias en agar* son, por lo común, de gran tamaño, extendidas por casi toda la superficie de la placa, de color blanco-amarillento o grisáceo, formando como un velo o película que se extiende; los bordes están, a veces, poco delimitados, como hundiéndose en el medio; otras son lobulados o con ramificaciones arborescentes lobuladas y bifurcadas (Lámina III, fig. 9 B; Lámina IV, fig. 14 A; Lámina IV, fig. 13), arborescentes y como festoneados (Lámina I, fig. 1), y también dendráticos. Estos velos cubren, en ocasiones, toda la placa, sin apreciarse los bordes, y sí

tan sólo las zonas de crecimiento. La superficie de estos velos puede ser lisa, brillante y húmeda, o también seca, con ligero brillo céreo o mate, de aspecto pulverulento; también puede ser rugosa, plegada, de color blanco ocráceo, mate. También forman colonias aisladas, pero que al crecer ofrecen tránsitos insensibles a las del tipo anteriormente descrito; así, se forman algunas veces colonias blancas, circulares, algo levantadas del medio, de unos 4 mm. o mayores, con bordes lisos o con forma irregular y bordes lobulados (Lámina I, fig. 3 A; Lámina IV, fig. 12 C; Lámina IV, fig. 14 B y C); la superficie puede ser rugosa, muy plegada (Lámina II, fig. 4 C); también desarrollan una zona central, irregular, con tendencia circular y superficie rugosa, plegada, de la que parten ramificaciones dendroides, de color blanco parduzco (Lámina IV, figura 12 B).

En el caldo forman velos lisos o rugosos que suben por las paredes, dejando el medio transparente como los de la fig. 15 de la lámina V. Por punción en gelatina producen una licuación infundibuliforme, a veves muy intensa (Lámina VI, fig. 21).

Morfológicamente son bacilos grandes y gruesos (Lámina V, figs. 19 y 20), móviles, de extremos redondeados, Gram-positivos (las cepas viejas pueden perder esta propiedad); la longitud oscila desde 1,4 a 2,8 micras y su diámetro 1,2 y hasta 1,8 micras. Espora elíptica, sin deformar.

En toda otra serie de caracteres estos bacilos se muestran, igualmente, como intermedios. La mayoría reducen los nitratos (carácter de *Cereus);* algunas cepas han fermentado la lactosa y la galactosa; todas han fermentado la glucosa, levulosa y sacarosa; hay variaciones respecto a la maltosa. Ninguna cepa ha producido gases al fermentar carbohidratos.

Diferentes autores han pretendido aislar bacilos característicos del tabaco. Tal Vernhout en 1900 (véase 9), que aisló el *Bacillus Tabaci-Fermentationis* y el *Bacterium Tabaci-Fermentationis,* perfectamente identificables con formas del *B. Subtilis* y *B. Pumilus*. S. J. Koning, entre 1898 y 1900 (véase 9), aísla también una serie de bacilos, unos aerobios estrictos y otros anaerobios, a los que llamó *Bacillus Tabaci* I, II, III, IV y V, los cuales se relacionan perfectamente con *Bacillus Proteus, Mycoides y Subtilis*. Reid, Mckinstry y Haley encuentran tipos análogos a los nuestros (11).

Hemos aislado también, del tabaco, tres cepas de *Flavobacterium Proteus,* clasificadas así por no formar espora, ser heterotróficos, no móviles; utilizan el nitrógeno orgánico y algún carbohidrato (glucosa), aunque tienen escaso poder fermentador; morfológicamente son bastoncitos Gram-negativos; son aerobios; no forman gases; producen pigmento amarillo anaranjado en sus colonias en agar, alcalinizan la leche tornasolada; reducen los nitratos; no hidroliza la gelatina.

Género *Micrococcus* (familia micrococáceas.

Bacterias en forma de esferitas o cocos sueltos o agrupados en paquetes; no forman endospora.

Hemos aislado 54 cepas de estos microorganismos, agrupadas así:

Micrococcus Pyogenes var. *Albus*	6 cepas
Micrococcus Candidus	7 cepas
Micrococcus Aurantiacus	21 cepas
Micrococcus Epidermidis	9 cepas
Micrococcus Conglomeratus	3 cepas
Micrococcus Ureae	3 cepas
Micrococcus Luteus	1 cepa
Micrococcus Caseolyticus	1 cepa
Micrococcus Varians	1 cepa
Micrococcus Flavus	1 cepa
Micrococcus Rhodochrous...	1 cepa

Se pueden hacer dos grupos en ellos, como en los *Bacillus:* unos más pequeños, con diámetros de 0,5 — 0,7 micras (tipo *Pyogenes-Candidus),* y otros, más gruesos y ligeramente ovales, de 0,9 — 1 — 1,2 micras de diámetro (tipo *Aurantiacus-Epidermidis-Ureae-Conglomeratus).* Fácilmente se comprende que algunos cocos de la lista anterior, de los que sólo se aisló una cepa, deben considerarse como meros contaminantes. *M. Luteus* y *M. Flavus* están pigmentados en amarillo, distinguiéndose porque *Luteaus* utiliza el $PO_4H_2NH_4$ como única fuente de nitrógeno, y *Flavus* no. En cuanto a *Rhodochrous* está pigmentado en rosa pálido o rojizo. En la Lámina IV pueden verse microfotografías de los tipos más representativos de *Micrococcus* aislados del tabaco. Son Gram-positivos.

Las *colonias en agar* de los *Micrococcus* ofrecen, en general, un aspecto bastante semejante en todos; son superficiales, blancas, redondea-

das, de superficie brillante; en general pequeñas (Lámina I, fig. 1; Lámina III, fig. 8; Lámina IV, fig. 14 D), de 1-2 mm. de diámetro, pero pueden alcanzar hasta 5-6 mm.; consistencia viscosa; algunas forman conjuntos muy características, como las de *M. Epidermidis* (Lámina III, figura 8). En profundidad suelen desarrollarse con aspecto estrellado.

En caldo los *Micrococcus* se desarrollan enturbiando uniformemente el medio y formando un sedimento abundante mucilaginoso o pulverulento (Lámina V, fig. 15 C).

A continuación ofrecemos un cuadro con las características más importantes de los *Micrococcus* del tabaco.

ESPECIE	Acetil-Metil-Carbinol	Almidón (hidrólisis)	Nitratos	Gelatina	Utilización del $PO_4H_2NH_4$ como única fuente de N.
M. Pyogenes var. *Albus*...	Negativa	Negativa	Reducidos	Licuada	No
M. Candidus..	Negativa	Negativa	No reducidos	No licuada	No
M. Aurantiacus. ...	Negativa	Negativa	Reducidos	No licuada	No
M. Epidermidis.. ...	Positiva	Negativa	Reducidos	No licuada	No
M. Conglomeratus...	Negativa	Negativa	Reducidos	Licuada	Sí
M Ureae	Negativa	Negativa	No reducidos	No licuada	Sí

FERMENTACION DE AZUCARES

	Maltosa	Glucosa	Levulosa	Sacarosa	Manita	Lactosa	Galactosa
Pyogenes	+	+	+	+	+	+ ó —	+ ó —
Candidus.	+	+	+	+	+	+	+
Aurantiacus. ...	+	+	+	+	+	+	+
Epidermidis. ...	+	+	+	+	—	+	+
Conglomeratus..	—	+	+	+	—	—	—
Ureae	+	+	+	+	+	+	—

Con respecto al indol, ninguna cepa lo ha producido.

Una cepa de *Candidus*, otra de *Aurantiacus* y otra de *Epidermidis* han producido SH_2.

Las cepas de *Ureae* han utilizado la urea como única fuente de nitrógeno, además del $PO_4H_2NH_4$.

La acción sobre la leche tornasolada ha sido variable, aun entre las cepas incluídas dentro de una agrupación específica; por ello, no hacemos una consideración especial de este carácter.

De acuerdo con las características registradas en los cudros anteriores, podemos diferenciar los cocos del tabaco de acuerdo con la siguiente

Clave para diferenciar los micrococos del tabaco.

1. Nitratos no reducidos a nitritos:
   A. Utiliza el $PO_4H_2NH_4$ y la urea como única fuente de nitrógeno ... ... *Micrococcus Ureae* Cohn.
   B. No utiliza el $PO_4H_2NH_4$ como única fuente de nitrógeno ... ... *Micrococcus Candidus* Cohn.

2. Nitratos reducidos a nitritos.
   A. Utiliza el $PO_4H_2NH_4$ como única fuente de nitrógeno. Gelatina licuada ... ... *Micrococcus Conglomeratus* Migula.
   B. No utiliza el $PO_4H_2NH_4$ como única fuente de nitrógeno.
      a) Gelatina licuada. Fermenta la manita ... ... *Micrococcus Pyogenes* var. *Albus* (Rosembach).
      b) Gelatina no licuada o licuada muy ligeramente.
         bb) Fermenta la manita. *Micrococcus Aurantiacus* (Schr.).
         bbb) No fermenta la manita ... ... *Micrococcus Epidermidis* (Winslow and Winslow) Hucker.

Koning, en 1900, aisló del tabaco un coco al que llamó *Diplococcus Tabaci Hollandicus;* se trata de un diplococo Gram-negativo cuyas características no coinciden bien con ninguna de nuestras cepas, ya que, entre otras cosas, todas han sido Gram-positivas (9).

Rossi, también en 1900, aisla una forma característica del tabaco Kentucky, la cual ha sido, con posterioridad, estudiada por Giovannozzi (4-1950). Se trata del *Micrococcus Nicotianae;* sus propiedades más características son: Gram-positivo; no licúa la gelatina; reduce los nitratos; fermenta débilmente glucosa y maltosa; inalterados otros azúcares; leche inalterada. Estas características parecen coincidir bastante con *M. Aurantiacus,* del cual la especie Rossi podría considerarse como sinónima; la cuestión quizá requiera un estudio más detenido (véase 9).

Reid, Mckinstry y Haley (11) aislaron hasta 711 cepas de cocos del

tabaco, que consideran principalmente como *Micrococcus Candicans* (= *M. Candidus*, ver la última edición del Bergey) y *Micrococcus Viticulosus* (= *M. Nicotianae* de Rossi = *M. Aurantiacus).*

Para toda la clasificación de nuestras cepas hemos seguido principalmente la última edicifin (6.ª, 1948) del «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» (Baltimore. The Williams and Wilkins Company).

Todas las cepas de *Bacillus* se desarrollan perfectamente en infusión de tabaco a pH neutro, alcalinizándola y formando velos consistentes, la mayoría de las veces rugosos y plegados, pero también lisos. En agar-infusión de tabaco también se desarrollan y producen catalasa.

Los *Micrococcus* también se desarrollan, en general, en la infusión de tabaco, aunque no todas las cepas lo hacen igual. No forman velos, sino sedimentos análogos a los formados en agar común; la infusión de tabaco es, también, alcalinizada. En agar-infusión de tabaco se desarrollan más o menos bien y producen catalasa.

III. VARIACIONES Y EVOLUCION DE LA POBLACION BACTERIANA EN LOS PILONES

Los diferentes microorganismos anteriormente citados no se encuentran siempre en la misma proporción; unos son más abundantes que otros, lo que se deduce del número relativo de cepas aisladas de cada uno. Pero, además, en cada momento o fase del período fermentativo hay una preponderancia de unas sobre otras. A continuación realizamos el agrupamiento de cepas, según la fase en la que han sido aisladas.

Con respecto a los *Bacillus*, hemos establecido anteriormente dos grupos:

Grupo I.—*Subtilis-Coagulans-Pumilus* ... ... 49 cepas
(Diámetro del bacilo menos de 0,9 micras)

Grupo II.—*Megatherium-Cereus-Mycoides* ... ... 48 cepas
(Diámetro del bacilo 0,9 micras o mayor)

He aquí ahora su agrupación, a lo largo de la fermentación:

BACILOS.—NUMERO Y PORCENTAJE DE CEPAS AISLADAS

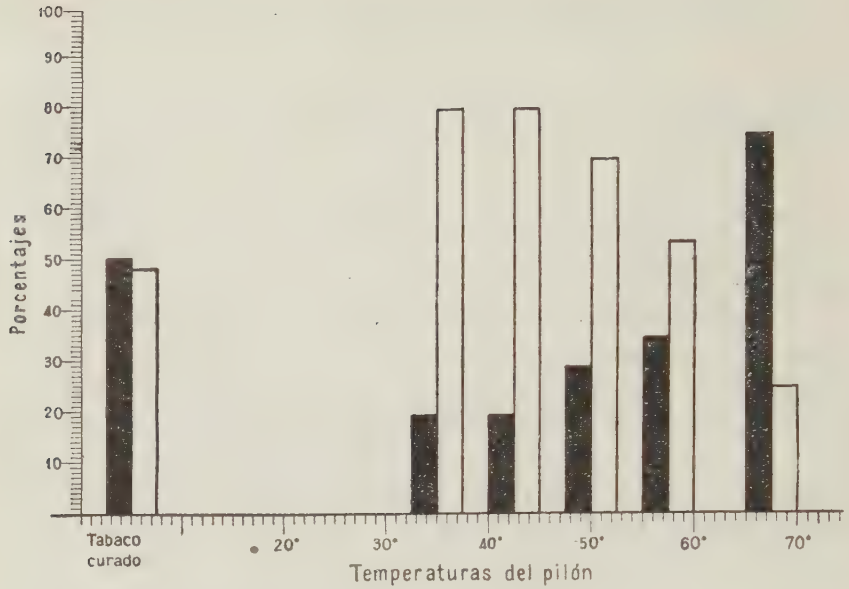
	GRUPO I	GRUPO II
Tabaco curado	21 cepas ... 51 %	20 cepas ... 49 %
Tabaco fermentado.		
A 35°...	1 cepa ... 20 %	4 cepas ... 80 %
De 40° a 45°...	1 cepa ... 20 %	4 cepas ... 80 %
De 48° a 53°...	3 cepas ... 30 %	6 cepas ... 70 %
De 56° a 60°...	6 cepas ... 46 %	7 cepas ... 54 %
De 65° a 70°...	12 cepas ... 75 %	4 cepas ... 25 %

Por consiguiente, se deduce que en el tabaco seco los dos grupos de bacilos se encuentran, sobre poco más o menos, en la misma proporción. Al iniciarse el proceso fermentativo, con temperaturas moderadas, los bacilos del Grupo II se mantienen, e incluso se multiplican moderadamente, de acuerdo con la humedad. Este período de multiplicación corresponde a temperaturas entre 33°-36°, y es el primero al que hemos hecho alusión en la pág. 5. El porcentaje de bacilos del grupo *Megatherium-Cereus-Mycoides* alcanza hasta un 80 por 100 cuando se llegan a los 40°-45°. A medida que aumenta la temperatura, los bacilos del Grupo I encuentran un medio más óptimo para desarrollarse, mientras que los del Grupo II disminuyen; este período corresponde a los 44°-47° y es el segundo a que hemos hecho referencia en el punto 4.° de la página 5. Los bacilos del grupo *Subtilis-Coagulans-Pumilus* alcanzan hasta un 75 por 100 desde los 55° a los 65°. Los bacilos de este grupo son, por tanto, más termófilos. En la gráfica IV queda claramente reflejada la distinta preponderancia de las formas bacilares. Durante la segunda fase del pilón, después de un cambio, son pocas las cepas aisladas para poder establecer porcentajes. Cuando se alcanzan temperaturas de 48° a 53°, se ha aislado una cepa de *B. Pumilus* y una de *B. Subtilis-Coagulans*. De 65° a 70°, una de *B. Subtilis*, otra de *B. Subtilis-Coagulans* y tres de *B. Megatherium-Cereus*. Por tanto, parece notarse una preponderancia del grupo *Subtilis-Pumilus-Coagulans*, que representan, poco más o menos, el 57 por 100 de las cepas aisladas contra un 43 por 100 del grupo *Megatherium-Cereus*.

Los cocos también se pueden distribuir en dos grupos:

I. Tipo pequeño (0,5-0,7 micras). *Pyogenes-Candidus*.

II. Tipo grueso (0,9-1 micras o más). *Aurantiacus-Epidermidis-Ureae Conglometarus*.



GRÁFICA IV.

Su agrupamiento es como sigue:

MICROCOCOS.—NUMERO Y PORCENTAJE DE CEPAS AISLADAS

	TIPO PEQUEÑO	TIPO GRUESO
Tabaco curado	4 cepas ... 57 %	3 cepas ... 43 %
Tabaco fermentado.		
A 35°...	0	3 cepas ... 100 %
De 40° a 45°...	2 cepas ... 100 %	0
De 48° a 53°...	3 cepas ... 37 %	5 cepas ... 63 %
De 56° a 60°...	2 cepas ... 6 %	14 cepas ... 94 %
De 65° a 70°...	1 cepa ... 16 %	5 cepas ... 84 %

Las cifras de estos porcentajes no guardan la proporcionalidad que las de bacilos, pero desde luego puede deducirse de ellas que, en el transcurso de la fermentación, al aumentar la temperatura, los cocos de tipo grueso persisten y se multiplican; en cambio, los de tipo pequeño disminuyen; entre los gruesos conviene destacar la preponderancia casi exclusiva de una especie, *Micrococcus Aurantiacus*, cuya afinidades con el presunto *M. Nicotinae* son bien evidentes, como hemos expuesto en el apartado anterior.

Durante la segunda fase del pilón, después de un cambio, los cocos de tipo pequeño representan, entre los 48° y 53°, un 12 por 100 de cepas, mientras los de tipo grueso representan un 88 por 100; entre los 65° y 70° el tipo grueso representa el ciento por ciento de cepas aisladas. Por consecuencia, durante la segunda fase del pilón, siguen predominando los cocos de tipo grueso.

Proporción de bacilos y cocos.

Durante una de las campañas estudiadas, precisamente en la de 1951-52, pusimos especial cuidado en contar y aislar separadamente las colonias de bacilos y cocos. El cuadro siguiente resume los resultados de este análisis.

TEMPERATURAS	Número total de bacterias	Bacilos	Cocos
Tabaco curado	599.166	532.500	60.666
Tabaco en fermentación.			
35°	210.000	175.000	35.000
47°	252.000	180.000	72.000
69°	59.000	24.000	35.000
Segunda fase del pilón.			
Al iniciarse	14.999	11.833	3.166
44°	4.000	2.500	1.500
51°	3.000	1.500	1.500
53°	7.000	4.200	2.800

Los números de bacterias se entienden por gramo de tabaco.

De la observación del cuadro anterior pueden deducirse los siguientes puntos:

1.º Las oscilaciones en el número de cocos no son tan pronunciadas como las de los bacilos, manteniéndose más constante a lo largo de la fermentación.

2.º Los períodos de aumento y disminución coinciden con los establecidos al hacer el estudio general de la población microbiana (pág. 5).

3.º Durante la segunda fase del pilón el número de cocos se mantiene también más constante que el de bacilos y sufre, igualmente, un aumento hacia los 53º.

4.º Como consecuencia de la disminución del número de bacilos y del mantenimiento, e incluso multiplicación del de cocos en el transcurso de la fermentación, se explica el hecho de que en las siembras de algunas muestras analizadas del final del proceso no se hayan desarrollado casi nada más que cocos, y precisamente el *M. Aurantiacus.*

5.º El aumento o multiplicación de microorganismos registrado a los 44º-47º, al que hacemos referencia en el punto 4.º de la página 5, se debe tanto a los cocos, fundamentalmente del tipo grueso, *M. Aurantiacus,* como a los bacilos del tipo *Subtilis-Pumilus.*

RESUMEN

En los pilones de tabaco, en fermentación, existen dos períodos de aumento y multiplicación de microorganismos y, por consiguiente, de posible actividad microbiana. Aunque se registra un gran variabilidad de unos pilones a otros, el primer incremento tiene lugar entre los 33º-36º y el segundo a los 44º-47º, siendo siempre mayor el primero que el segundo. En el primero, el número de bacterias puede llegar hasta 1.240.000 por gramo (en el tabaco curado es de unas 500.000); en el segundo, el número sube de unas 35.000 a 200.000. Unos pilones suben más rápidamente que otros, por lo cual la fecha en que alcanzan el primer máximo es variable, si bien dentro de los cinco primeros días. De los 50º en adelante (60º-70º) el número de bacterias es cada vez menor. En la segunda fase del pilón, después de un cambio, hay una disminución inicial, seguida de un aumento del número de micro-organismos a los 53º-57º. Después el número disminuye.

La multiplicación y aumento de bacterias coincide, siempre, con aumento, o al menos estabilización de la humedad. Cuando ésta disminuye, nunca hay aumento de microorganismos. Las humedades son, en

general, bajas (12-17 por 100; como máximo, 21 por 100); por eso son igualmente pequeños los números de bacterias. En las zonas laterales del pilón, que se mantienen durante más largo tiempo a temperaturas no demasiado elevadas, existe una actividad e influencia microbiana mayor que en el centro del mismo.

Se puede suponer la existencia, en el tabaco, de dos tipos o grupos de bacterias: unas, que encuentran su óptimo de multiplicación a los 33°-36°, y otras, que lo tienen a los 44°-47°.

Las bacterias aisladas y estudiadas pertenecen, fundamentalmente, a dos grupos: *Bacillus* y *Micrococcus*.

Los *Bacillus* aislados pertenecen a dos tipos: *B. Megatherium-Cereus* (diámetro del bacilo mayor de 0,9 micras), que hasta los 40°-45° representan el 80 por 100 de las cepas aisladas (multiplicación a los 30°-36° aludida anteriormente), y *B. Subtilus-Pumilus* (diámetro del bacilo menor de 0,9 micras), que desde los 55° a los 65° alcanzan el 75 por 100 de las cepas (multiplicación a los 44°-47°).

Los *Micrococcus* pertenecen a dos tipos: unos pequeños, con diámetros de 0,5-0,7-0,8 micras (corresponden, sobre todo, a la especie *M. Candidus)*, y otros más gruesos, con diámetros de 0,9-1 micras, y además ligeramente ovales *(M. Aurantiacus-Epidermidis)*. En el transcurso de la fermentación, al aumentar la temperatura, los cocos de tipo pequeño disminuyen y, en cambio, los gruesos persisten y se multiplican.

Todos estos microorganismos se desarrollan bien en extractos de tabaco, a los que alcalinizan. Igualmente se desarrollan en agar-infusión de tabaco, produciendo catalasa.

SUMMARY

In fermenting tobacco stacks, there are two multiplication periods and microorganisms increase and, consequently, of possible microbial activity. Though it is remarked a big difference among the stacks, the increase take place between the 33°-36°, and the second, at the 44°-47°, being always greater the first than the second. In the first, the bacteria number can to amount till 1.200.000 per gram (in tobacco cured it is about 500.000); in the second, this number amount from about 35.000 until 200.000. Any stacks increase more rapidly than others, and, therefore, it is variable the date in which they have reached its first ma-

ximum, though in the course of the first five days. From the 50° henceforth (60°-70°), the bacterie number is every time smaller. In the second phase of the stack, after a change, there are a initial reduction, followed of a increase of the number of microorganisms at the 53°-57°. After, the number decrease.

The multiplication and increase of bacteria coincide always with a increase or, at least, stabilization of humidty. When this decrease never there are microorganisms increase. In general, the moistures are low (12-17 %, maximum 21 %) and by this reason are likewise short the microorganisms number. In the lateral zones of the stacks, mantained during more large time at temperatures not excessive high, there are one activity or influence microbial greater than in the centre of the same.

It can be supposed, in the tobacco, the existance of two types of groups of bacteria; one wich find its multiplication optimum a the 33°-36°, and others, at the 44°-47°.

The isolated and studied bacteria belong, fundamentally, to two groups: *Bacillus* and *Micrococcus.*

The isolated *Bacillus* belong, likewise, to two grops *B. Megatherium-Cereus* (bacillus diameter larger than 0,9 micras), which till the 40°-45° they represent the 80 % of the ceps isolated (multiplication from the 30°-36°); and *B. Subtilis-Pumilus* (bacillus diameter smaller than the 0,9 micras), which from 55° till the 65° come up the 75 % of ceps (multiplication at the 44°-47°).

The *Micrococcus* belong to two types: ones, small and with diameter of 0,5-0,7-0,8 micras, to them correspond specially the *M. Candidus* and other more large, with diameter of 0,9-1 micras and, further, slightly oval *(M. Aurantiacus* and *M. Epidermidis).* In the course of the fermentation, increasing the temperature, the coccus small type decrease and, instead, the gross persist an increase.

All these microorganisms are good developed in tobacco extract, to which they change into alkali. Likewise are developped in agar infusion of tobacco, producing catalase.

BIBLIOGRAFIA

(1) Alcaraz, E., y R. Beneyto. Trabajos microbiológicos sobre la fermentación de los tabacos españoles. Memoria General de los Ensayos del Cultivo del Tabaco en España, correspondiente al quinquenio 1826-30. Madrid, 1931.

(2) ALCARAZ, E. Estudio del proceso técnico de la fermentación del tabaco. Estado actual del conocimiento de este proceso. I, Congreso Nacional de Ingeniería Agronómica. Tema VIII, Subgrupo B-11. Madrid, marzo 1950.

(3) FREY-WYSSLING, A. La modification chimique du tabac au cours du sechage et de la fermentation. Communications presentées a la Conference Europeénne du Tabac. Pags. 203-205. Roma, septiembre 1950.

(4) GIOVANNOZZI, M. Studi sulla fermentazione del tabacco. Bolletino Técnico de Scafati, 1935,1941. Il Tabacco (Roma), 1947-1948-1950.

(5) GIOVANNOZZI, M.: Sur la methode microbiologique des Tabacs. Le Tabac. N.º 1-2 (marzo-junio), 1940. Págs. 35-39.

(6) GIOVANNOZZI, M. La Fermentazione dei Tabacchi. Ente Nazionale per il tabacco. Roma, 1940.

(7) IZQUIERDO TAMAYO, A., and F. GONZÁLEZ CANCHO. Microbiology of fermentation of Spanish Tobacco. VI Congresso Internazionale di Microbiologia. Roma, 6-12. XIX. 277. Septiembre 1953.

(8) IZQUIERDO TAMAYO, A., et F. GONZÁLEZ CANCHO. La Flore microbienne du Tabac. Comunicación presentada al I Congreso Científico Internacional del Tabaco. París, septiembre 1955.

(9) IZQUIERDO TAMAYO, A. Estudios sobre la flora bacteriana del tabaco (tesis doctoral). Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas. Madrid, 1956.

(10) JENSEN, C. O., et PARMELE, H. B. Fermentation of cigar-type tobacco. Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 42, N.º 3. Mars 1950 (páginas 519-522).

(11) REID, J. J.; MCKINSTRY, D. W., y D. E. HALEY. Studies on the Fermentation of tobacco Pensylvania Agricultural Experiment Station; Bulletin 1938. Journal of Bacteriology, 1937 y 1938.

(12) SMITH, N. R.; R. E. GORDON y F. E. CLARK. Aerobic sporeforming Bacteria. Agriculture Monograph N.º 16. United States Department of Agriculture. 1952.

INDICE DE LAMINAS

Lámina I.—Figura 1.ª Colonias desarrolladas en una siembra de tabaco curado en agar-común. A y B corresponden a un velo extendido del *Bacillus Megatheriur-Cereus*. C son diminutas colonias de *Micrococcus* sp.

Figura 2. Colonias desarrolladas en una siembra de tabaco curado en agar común, después de incubada la placa durante cinco días a 37°. A y A', colonias del *Bacillus Pumilus*. B, colonias de un *Micrococcus*. C, micelio de un *Penicillium*.

Figura 3. Colonias desarrolladas en una siembra de tabaco curado en agar común. A, colonias de *Bacillus Megatherium-Cereus*. B, colonia del *Bacillus Pumilus*.

Lámina II.—Figura 4. Colonias desarrolladas en una siembra de tabaco curado en agar común. A, velo de *Bacillus-Pumilus*. B, colonias del *Bacillus Subtilus-Pumilus*. C, colonias del *Bacillus Megatherium-Cereus*.

Figura 5. Colonias desarrolladas en una siembra de tabaco curado en agar común. A, velo de *Bacillus-Pumilus*. B, colonias lonias de *Bacillus Pumilus*. C, colonia de *Bacillus Mycoides*. D, colonia de *Bacillus Subtilis-Pumilus*.

Figura 6. Colonias extendidas, con ramificaciones rizoides, del *Bacillus Mycoides*, desarrolladas en una siembra de tabaco curado en agar-infusión de tabaco.

Lámina III.—Figura 7. Colonia de *Bacillus Pumilus*, desarrollada en una siembra de tabaco curado en agar común.

Figura 8. Colonias de *Micrococcus Epidermidis*, desarrolladas en una siembra de tabaco fermentado en agar común. (El tabaco alcanzó 71°).

Figura 9. Colonias desarrolladas en una siembra de tabaco fermentado, que alcanzó 47°, en agar común. A, colonias de *Bacillus Subtilis*. B, velo extendido del *Bacillus Megatherium-Cereus*.

Figura 10. Colonias de *Bacillus Subtilis*, desarrolladas en una siembra de tabaco fermentado, que alcanzó 65°, en agar común.

Figura 11. Colonia de *Bacillus Subtilis-Pumilus*, desarrollada en una siembra de tabaco fermentado, que alcanzó 69°, en agar común.

Lámina IV.—Figura 12. Colonias desarrolladas en una siembra de tabaco fermentado, que alcanzó 60°, en agar-infusión de tabaco. A, colonia de *Bacillus Subtilus*. B, colonias de *Bacillus Megatherium-Cereus*. C, colonias de *Bacillus Megatherium-Cereus*. D, colonia de *Bacillus Pumilus*.

Figura 13. Colonia extendida en forma de velo, del *Bacillus Megatherium-Cereus*, desarrollada en la siembra de tabaco fermentado, que alcanzó 71°, en agar común.

Figura 14. Colonias desarrolladas en la siembra de tabaco fermentado, que alcanzó 35°, en agar común. A, colonia extendida de *Bacillus Megatherium-Cereus*. B y C, colonias de *Bacillus Megatherium-Cereus*. D, colonia de *Micrococcus Conglometarus*.

Lámina V.—Figura 15. Desarrollo en caldo. A, *Bacillus Subtilis*, formación de una película o velo rugoso; caldo transparente). B, *Micrococcus Pyogenes* (caldo enturbiado). C, tubo de control.

Figura 16. *Bacillus Cereus.* A, formas vegetativas, en agrupación estreptobacilar. C, formas esporulantes y esporas.
Figura 17. *Bacillus Subtilis.* Formas vegetativas.
Figura 18. *Bacillus Subtilis.* Cultivo de cuarenta y ocho horas. Formas esporulantes y esporas.
Figura 19. *Bacillus Megatherium-Cereus.* Formas vegetativas.
Figura 20. *Bacillus Megatherium-Cereus.* Cultivo de cuarenta y ocho horas. Formas esporulantes y esporas.

(Todos los *Bacillus,* en preparaciones teñidas por el método de Gram. Aumentos 1.000 x).

LÁMINA VI.—Figura 21. Licuación infundibuliforme de la gelatina, producida por la siembra del *Bacillus Megatherium-Cereus,* en 1 y 2. En el centro, tubo de control.
Figura 22. *Micrococcus Candidus.*
Figura 23. *Micrococcus Ureae.*
Figura 24. *Micrococcus Epidermidis.*
Figura 25. *Micrococcus Aurantiacus.*
Figura 26. *Micrococcus Aurantiacus.*

(Todos los *Micrococcus,* en preparaciones teñidas por el método de Gram. Aumentos, 1.000 x).

FIG. 1.

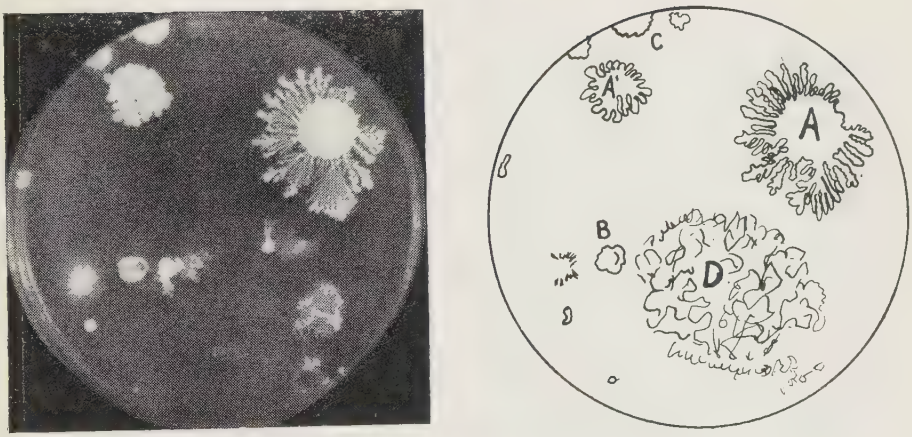


FIG. 2.

FIG. 3.

FIG. 4.

FIG. 5.

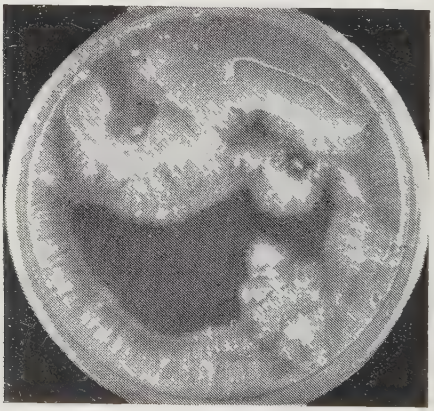


FIG. 6.

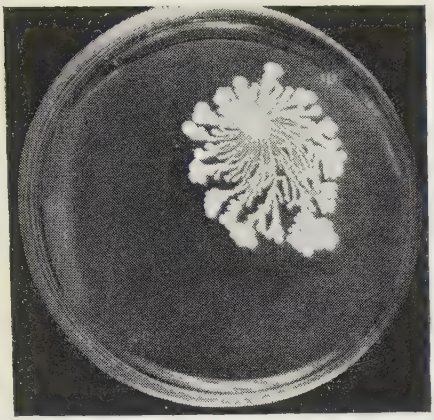


FIG. 7.

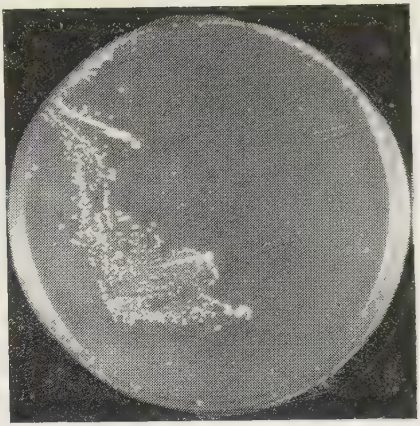


FIG. 8.

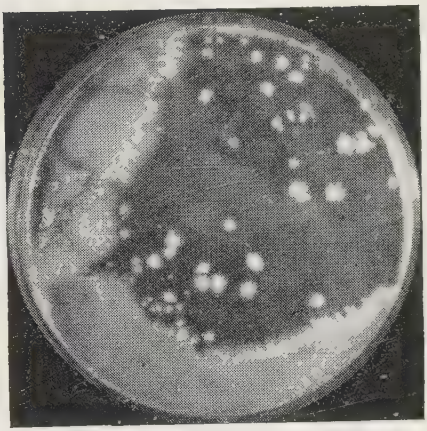


FIG. 9.

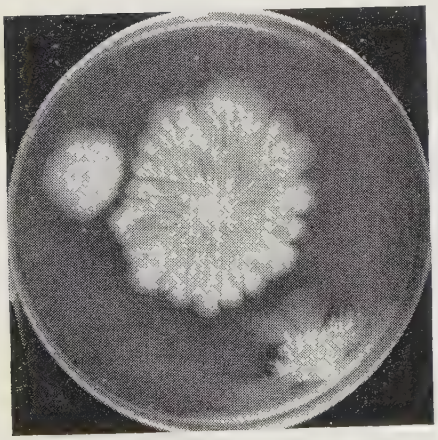


FIG. 10.

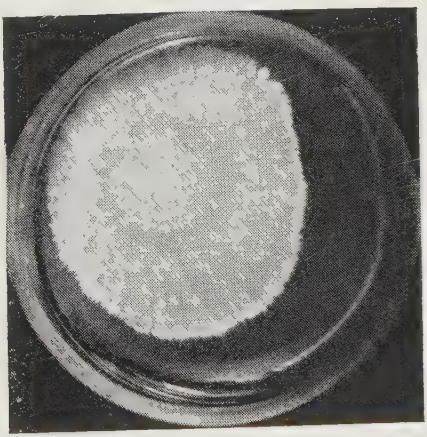
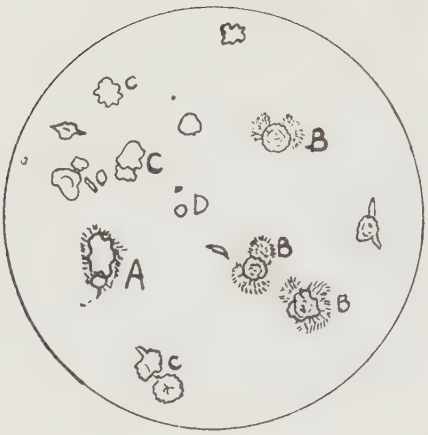


FIG. 11



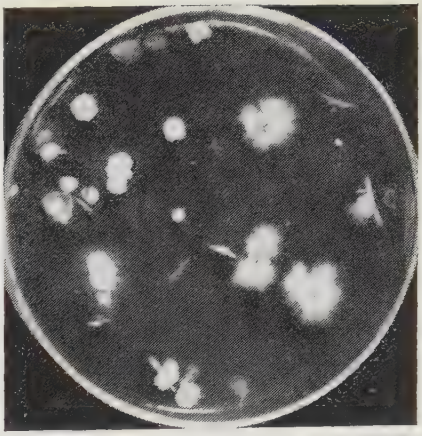


FIG. 12.

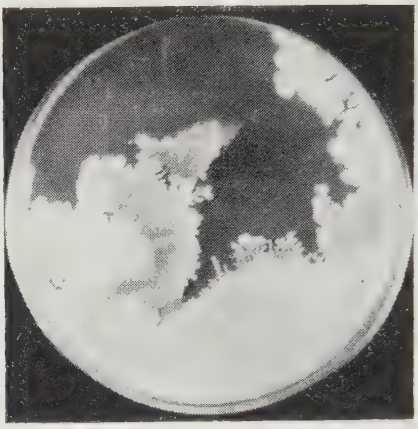


FIG. 13.

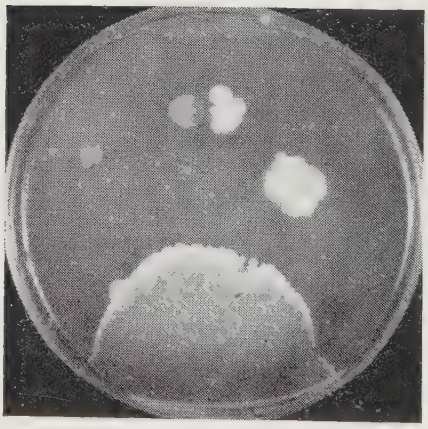
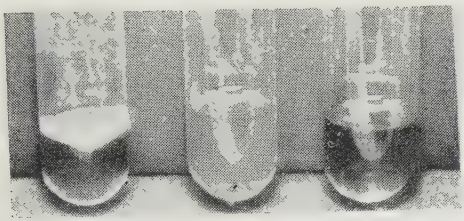
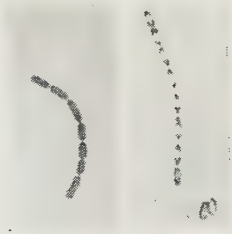


FIG. 14.



A B C

FIG. 15.



A B

FIG. 16.

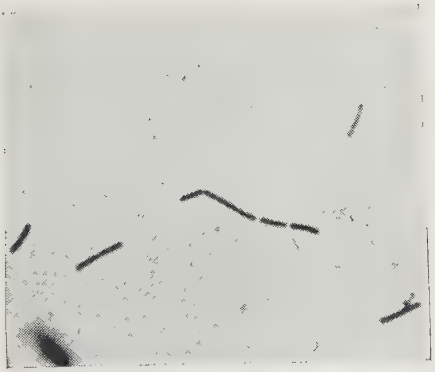


FIG. 17.

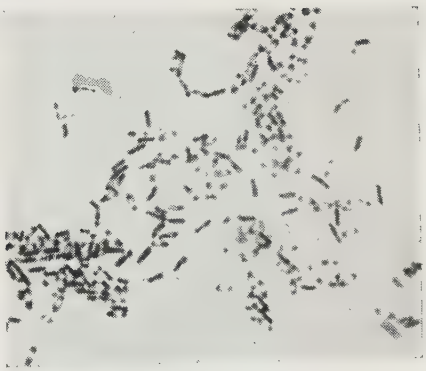


FIG. 18.

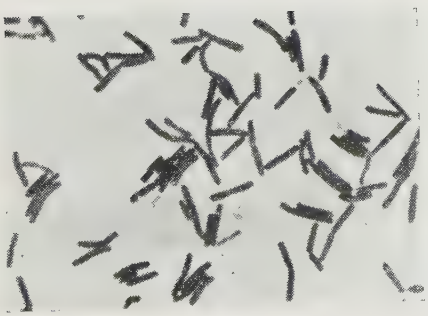


FIG. 19.

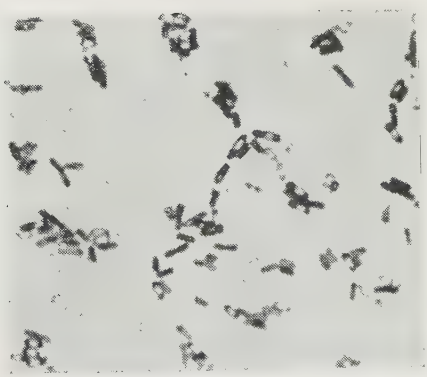


FIG. 20.

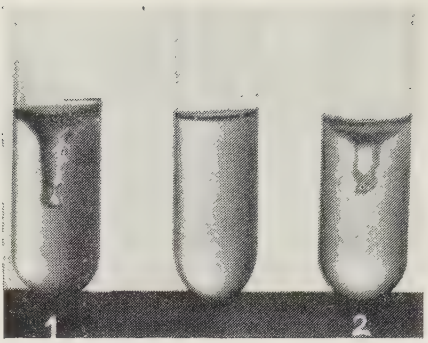


FIG. 21.

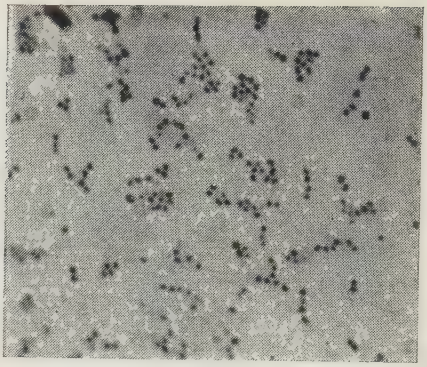


FIG. 22.

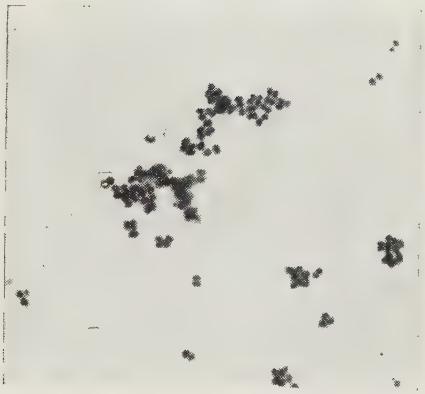


FIG. 23.

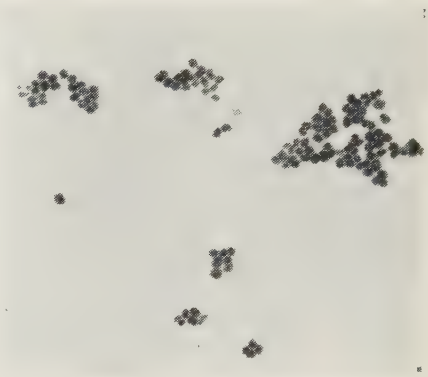


FIG. 24.

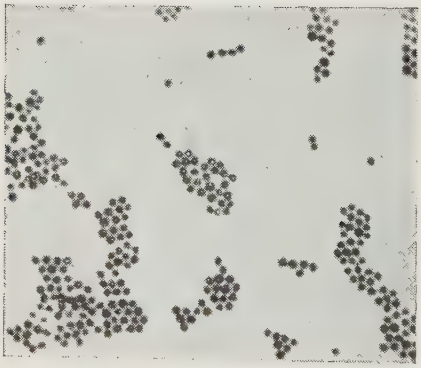


FIG. 25.

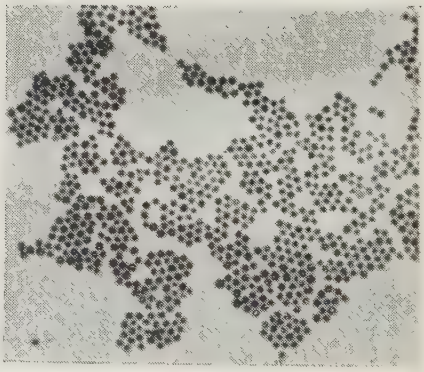


FIG. 26.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN" DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR FERMENTACION

I. Selección de mutantes, medio de esporulación y factores de preparación del medio de fermentación

POR

José Luis Malo Echevarría y Benito Regueiro Varela

INTRODUCCION

Dentro del campo, cada día más prometedor, de las fermentaciones industriales, la producción de ácido cítrico por acción de los hongos sobre medios azucarados es uno de los procesos más estudiados y quizá menos conocidos, en cuanto a su mecanismo, y de más difícil control en cuanto a su práctica.

Con la producción de penicilina, son las dos fermentaciones a las que se deben mayores avances en el campo del metabolismo microbiano y en le dominio de las técnicas de fermentación.

El objetivo práctico de toda fermentación industrial es el conseguir la mayor producción de una determinada sustancia dentro de la mayor economía. Para lograr esto no es suficiente que, cultivando un determinado microorganismo en un determinado medio y con unas técnicas conocidas, se ponga en marcha el proceso.

Estos, en último término, son puntos de partida para el estudio, en escala de laboratorio, de las múltiples variables o factores físicos, químicos y biológicos que se presentan en cada lugar y situación.

De todos los microorganismos es quizá el hongo *Aspergillus niger*, productor de ácido cítrico, uno de los más sensibles a los factores señalados; de aquí la dificultad de que los resultados entre diferentes laboratorios sean concordantes.

En la presente serie de trabajos intentamos llegar a la puesta en marcha, en escala de laboratorio, de un proceso de producción de ácido cítrico por fermentación, en superficie y en sumergido, a partir de materias primas nacionales, estudiando los factores o variables necesarios para conseguir unos rendimientos remuneradores.

En este primer trabajo estudiamos los métodos de obtención de mutantes de *Aspergillus niger,* tanto por selección natural como por irradiación ultravioleta. También se estudian algunos factores del medio de germinación que pueden influir después en la fermentación en medio sintético. Por último, estudiamos otros factores que pueden influir en la fermentación y que se relacionan con las técnicas de preparación de dicho medio sintético.

HISTORIA

Dentro de los sesenta años que la producción de ácido cítrico por fermentación tiene de existencia, se han realizado numerosos trabajos, a los más importantes de los cuales se hace referencia en los libros de Prescott y Dunn (1949), Foster (1949) y Underkofler e Hickey (1954), y en revisiones anuales que realizan algunas revistas.

El ácido cítrico fué aislado por primera vez por Scheele (1784), a partir del jugo de limón, y hasta hace unos veinticinco años ésta era la principal materia prima para su obtención. Sin embargo, hoy día el 90 por 100 del ácido cítrico es obtenido por acción de los hongos sobre medios azucarados por un proceso de fermentación.

La historia del desarrollo de la producción de ácido cítrico por fermentación la podemos dividir en tres períodos. El primero comprende lo que podríamos denominar *fermentación original,* el cual comienza en 1893, y en el que se utiliza el hongo del género *Penicillium* como agente productor. El segundo, que comienza en 1917, se podría denominar de *fermentación superficial,* y ya se utiliza el género *Aspergillus.* El tercero, que empieza en 1938, se denominaría de *fermentación sumergida.*

El botánico alemán Carl Wehmer (1893) descubre que algunos hongos son capaces de producir ácido cítrico, cuando se desarrollan sobre azúcar. A estos hongos los llama *Citromyces,* aunque más tarde el micólogo americano C. Thom los incluyó entre los *Penicillium.*. Estos hongos se aíslan del aire de diferentes sitios.

Utilizó Wehmer, como medio de fermentación, azúcar en cantidad

del 10 por 100 al 20 por 100 y sales como nitrato amónico, fosfato potásico y sulfato magnésico, pudiendo también añadirse carbonato cálcico. Realiza la fermentación a temperatura ambiente, y a los veintiocho a cuarenta y dos días obtiene un 50 por 100 de conversión del azúcar en ácido cítrico. Señala que el ácido cítrico, así como otros ácidos orgánicos, se acumulan en el medio como productos de una oxidación incompleta del azúcar.

En la exposición de los resultados de las experiencias de Wehmer se observa una gran vaguedad; esto es debido a que pensaba en industrializar el proceso, en lo cual no obtuvo el éxito que esperaba. Esto se debió a varias causas, la principal de las cuales fué la debida a las contaminaciones, pues los hongos utilizados necesitaban un pH cercano a la neutralidad, por lo cual dichas contaminaciones eran fáciles de producirse.

Varios investigadores siguieron los trabajos de Wehmer con el género *Penicillium*, pues se creía que el género *Aspergillus* solamente producía ácido oxálico. Sin embargo, Thom & Currie (1916) encontraron que la acidez titulable excedía a la producida por oxálico, viéndose entonces que era debida al ácido cítrico.

Realiza entonces Currie (1917) el trabajo fundamental en la fermentación cítrica, encontrando que razas de *Aspergillus*, sobre todo el *Aspergillus niger*, cuando crece a un pH muy bajo, en soluciones de sacarosa al 15 por 100, en presencia de sales inorgánicas, transforman un 55 por 100 de la sacarosa del medio en ácido cítrico.

El medio de fermentación lo ponía en bandejas, o bien en cantidad de 50 c. c. en matraces de 200 c. c. La incubación era a 28°, durante ocho días.

El medio de fermentación y las cantidades de sus componentes, utilizado por Currie, son las siguientes:

Sacarosa	12,50	— 15,00	%
Nitrato amónico	0,20	— 0,25	%
Fosfato monopotásico	0,075	— 0,10	%
Sulfato magnésico	0,02	— 0,025	%

El pH inicial es de 3,4 con ácido clorhídrico. El *Aspergillus niger* puede acumular ácido cítrico hasta bajar el pH a 2.o. Este fué el más bajo que hasta entonces podía soportar una célula viva. Si el pH subía

entonces se producía más ácido oxálico. Otras ventajas de este pH son el que evitaba contaminaciones y facilitaba la esterilización.

Pocas variaciones se realizaron en los métodos de Currie hasta la aparición de la fermentación sumergida, siendo el objetivo de los autores que trabajaron en producción de ácido cítrico por fermentación superficial en medio sintético, en escala de laboratorio, el estudiar las variables o factores con que trabajaba cada uno.

Sistemáticamente los factores a que nos referimos son los siguientes: 1, microorganismo; 2, medio de fermentación (azúcares, sales inorgánicas, iones metálicos, otras sustancias); 3, factores físicos (pH, temperatura, relación área/volumen, técnicas de fermentación).

Vamos a revisar ahora las investigaciones que sobre los factores anteriores han realizado otros autores y que tienen relación con el contenido del presente trabajo.

1. *Microorganismo.*

Existe acuerdo entre todos los autores de que el género *Aspergillus* es el mejor productor de ácido cítrico encontrado. Descripción y clasificaciones de este hongo puede encontrarse en el libro que sobre él escribieron Thom y Raper (1945).

Desde luego, entre diferentes razas de *Aspergillus niger* hay diferencias respecto a su capacidad productora y a sus condiciones óptimas de fermentación. Como regla general, puede afirmarse que una misma raza no actúa igual en todos los laboratorios, debido seguramente a ligerísimas diferencias en las condiciones de fermentación. M. J. Johnson considera que variaciones en el rendimiento de una raza, más que a cambio de cultivo, se debe a cambios difíciles de reconocer, ya en la composición del medio, ya en otras condiciones.

Aunque al comienzo de todo trabajo en fermentación cítrica suelen emplearse razas conocidas y comprobadas en otros laboratorios, por las razones antes indicadas, hay que recurrir siempre a buscar mutantes que se adapten a nuestras condiciones de trabajo; esto suele realizarse por pruebas de selección natural o por obtención de mutantes por irradiación ultravioleta, técnicas que son las primeras utilizadas en nuestro trabajo y de las que se tratará más adelante.

D. Perlman (1946) observa que los subcultivos obtenidos por aislamiento de esporas de la colonia de una determinada raza, presentan grandes diferencias en su propiedad de producir ácido cítrico. En general,

no suelen existir diferencias morfológicas o fisiológicas, sino que la única diferencia es la de producir más o menos ácido cítrico. Técnicamente, lo que interesa es aislar y probar los individuos más productores.

Otro de los problemas que se presenta en la práctica con el microorganismo es el de su estabilidad. Varios autores observaron la pérdida de la facultad de producir ácido cítrico en algunas razas. Entre nosotros este problema fué estudiado por Marcilla y Xandri (1947), que lograron estabilizar el cultivo y a veces regenerar su capacidad productora, haciendo subcultivos continuos en medio agar-mosto de uva-peptona, y aún mejor en agar-mosto de cerveza-peptona. En nuestro caso, aparte de trabajar con una raza muy estable, conservamos sus propiedades poniendo las esporas en tierra por la técnica que se indicará más adelante.

2. *Medio de fermentación.*

Este es el factor más importante, después del microorganismo. Normalmente el *Aspergillus niger* produce ácido cítrico, pero para producirlo en cantidades remunerables debe de suministrársele un medio en el cual el hongo se desarrolle *patológicamente* y produzca más ácido cítrico del necesario a su metabolismo normal.

El medio de fermentación llena dos funciones: una, la de permitir el crecimiento del hongo, y otra, la de contribuir a la producción de ácido cítrico. Un medio puede ser apropiado para una función y no para otra; también puede cumplir las dos funciones.

En general, los medios utilizados por diferentes autores fundamentalmente es el mismo de Currie, aunque existen diferencias cuantitativas. Los componentes básicos son: azúcar, sales minerales, iones metálicos. Dice Johnson (1954) que para que se produzca ácido cítrico debe faltar en el medio algún elemento nutritivo que produzca una deficiencia enzimática, la cual da lugar a la producción del ácido. Existen varios tipos de estas deficiencias nutritivas.

En los medios sintéticos el *azúcar* generalmente utilizado es la sacarosa. La cantidad a poner óptima es de 10 a 20 por 100. Cuando se esteriliza el medio dicen algunos autores que se produce una hidrólisis parcial de la sacarosa, lo que da lugar a una disminución del rendimiento en ácido cítrico.

Se denomina *medio basal* aquel que contiene solamente azúcar y *sales minerales inorgánicas,* que generalmente son siempre las mismas,

y también las empleadas por Currie. Varios autores estudiaron la influencia cualitativa y cuantitativa de estas sales en la producción de ácido cítrico. Doelger y Prescott (1934) observan que si se pone más de un 0,25 por 100 de nitrato amónico, 0,15 por 100 de fosfato monopotásico y 0,03 por 100 de sulfato magnésico, se aumenta la cantidad de ácido oxálico producida y disminuye la de ácido cítrico. También señalan que más de un 0,25 por 100 de nitrato amónico aumenta la producción de micelio. Wells y Herrick (1938) dicen que, en vez de nitrato amónico, es mejor emplear nitrato sódico (0,4 por 100) o potásico (0,35 por 100). En nuestros trabajos utilizamos el *medio basal* sin modificaciones.

En la fermentación cítrica es muy importante la adición de *iones metálicos:* un metal puede dar lugar a una acción perjudicial, una acción beneficiosa o ser indiferente. Esto depende mucho de la raza de hongo utilizada.

La importancia de estos iones es fundamental en la producción de ácido cítrico por fermentación; pero como en esta primera parte no se incluyen los trabajos realizados sobre esta cuestión, dejaremos para la parte en que se estudia esto lo relativo a la revisión de los trabajos de otros autores en iones metálicos.

3. *Factores físicos.*

Aparte del microorganismo y del medio de fermentación, la producción de ácido cítrico por fermentación en medio sintético y en superficie en escala de laboratorio está influenciada por ciertos factores físicos.

El *pH* es uno de ellos, pues su mantenimiento en un punto óptimo es fundamental. Ya hemos visto antes que Currie (1917) demostraba que variaciones de pH afectaban a la proporción de ácido cítrico y oxálico producido. En éste, como en otros factores, tiene gran importancia la raza de hongo utilizada y su tolerancia a la acidez. Parecería que al bajar el pH, al ir produciéndose ácido cítrico (pH : 1,8 — 2,0), se inhibiría el crecimiento; pero se observa que el ácido se encuentra ionizado de tal manera que a grandes aumentos de ácido el pH varía ligeramente (aumento de ácido del 10 al 20 por 100 da una variación de pH de 1,6 a 1,4). La presencia de azúcar frena la utilización del ácido cítrico por el hongo, como fuente de carbono; por esta razón debe darse por terminada toda fermentación un momento antes de la total utilización del azúcar.

La *temperatura* es otro factor físico importante. En general, la óptima está entre 28° y 30°, aunque algunos autores, como Bernhauer, prefieren la de 32° a 35°, mientras que otros utilizan primero una de 28° y luego otra de 20°. Aquí también influye mucho la raza de hongo utilizada y el medio empleado.

Doelger y Prescott (1934) dicen que la producción de ácido cítrico por fermentación va aumentando a medida que aumenta la temperatura de 8° a 28°, indicando que por encima de 30° disminuye la producción de ácido cítrico y aumenta la de oxálico. Kitos, Campbell y Tomlinson (1953) dicen que la temperatura influye también en las necesidades en iones metálicos.

En las fermentaciones superficiales influye también la *relación área/volumen.* Como la conversión de azúcar en ácido cítrico se realiza por medio de enzimas intracelulares, el azúcar necesita pasar al interior del micelio y el cítrico difunde a través de dicho micelio al exterior; esto se realiza en la superficie de contacto entre micelio y medio. En un recipiente de mucho volumen la formación de ácido es lenta, pues la superficie de contacto es pequeña. El óptimo de este factor es aquel en el que se logre la máxima conversión en el menor tiempo y con un mínimo de azúcar no utilizado. En general, se utiliza una profundidad de 1,0 a 2,5 cm., aunque algunos autores llegan a 5,0 y hasta 8,0 cm.

Por último, también influye en el rendimiento de la fermentación la forma o *técnica de fermentación empleada.* En escala de laboratorio suelen emplearse matraces Erlenmeyer de diferente tamaño y con diferentes cantidades de medio, esterilizados al autoclave. Cuando se siembra el *Aspergillus niger* éste germina en pocas horas, y a los dos-cinco días la superficie del medio se encuentra totalmente cubierta. Empieza entonces la producción de ácido cítrico, que acaba en siete a diez días. Doelger y Prescott (1934) utilizan matraces de 250 c. c. con 75 c. c. de medio, incuban a 26° y terminan a los diez días.

Krishnan, Bajaj y Damle (1954) dicen que la forma de tomar las esporas del medio de esporulación puede afectar a los resultados finales, pues esporas lavadas dan diferentes resultados que las sin lavar. Adición de un extracto acuoso de medio de esporulación afecta también a estos resultados. Esto se explica por la posible existencia en el medio de esporulación de una sustancia inhibidora, que se separa por lavado, pues también esporas lavadas crecen mejor que las sin lavar.

METODOS

Todos los métodos empleados en esta parte del trabajo caben en dos apartados: uno, el relativo al microorganismo, medios y técnicas de fermentación, y otro, el relacionado con la toma de muestras y las determinaciones a realizar.

A lo largo de nuestro trabajo utilizamos la raza de *Aspergillus niger* 72 — 4 Wis. amablemente enviada por el profesor M. J. Johnson, de la Universidad de Wisconsin, que, por otra parte, es la más utilizada en todas las investigaciones sobre fermentación cítrica, debido sobre todo a su estabilidad y capacidad productora. Esta raza fué enviada en medio de esporulación, a partir del que se realizaron posteriores subcultivos, expresados en la siguiente forma gráfica (fig. 1):

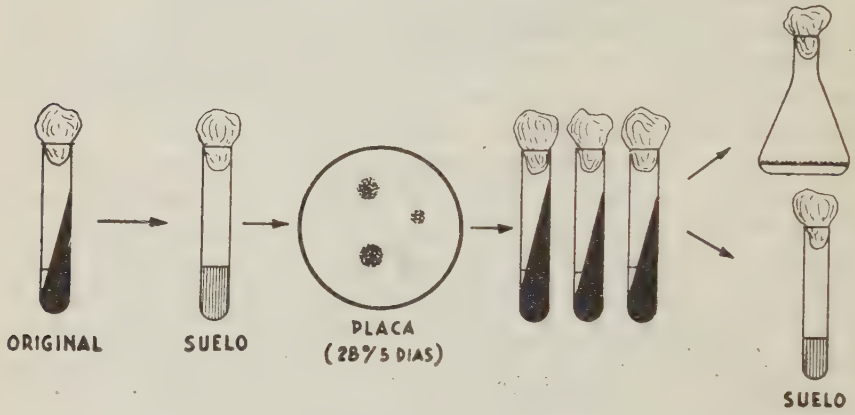


FIG. 1.

Los *tubos de tierra* se preparan por una técnica dada particularmente por el profesor Backus, de la Universidad de Wisconsin, y que consiste en lo siguiente: tierra de jardín, finamente machacada en mortero, se mezcla con un 50 por 100 de arena de cuarzo. Se pone en matraz de un litro, humedece con agua y esteriliza tres veces en una semana, durante cuatro horas, y en autoclave. Cantidades de 5 grs. se ponen en tubo de 160 por 16 mm., humedece con agua, cierran con algodón y esterilizan una hora en autoclave, y después dos horas a 175° en horno.

Así quedan dispuestos para su empleo, añadiendo un centímetro cúbico de suspensión de esporas y conservando a temperatura ambiente.

A partir de estos tubos puede realizarse la *selección natural* en busca de nuevas razas. Para esto se siembran placas con medio de esporulación y dejan a 28° hasta formación y esporulación de colonias aisladas, las cuales se prueba su capacidad productora, separando las colonias mejores en tubo con medio de esporulación y tierra posteriormente para su conservación. El esquema gráfico de la selección natural es el siguiente (fig. 2):

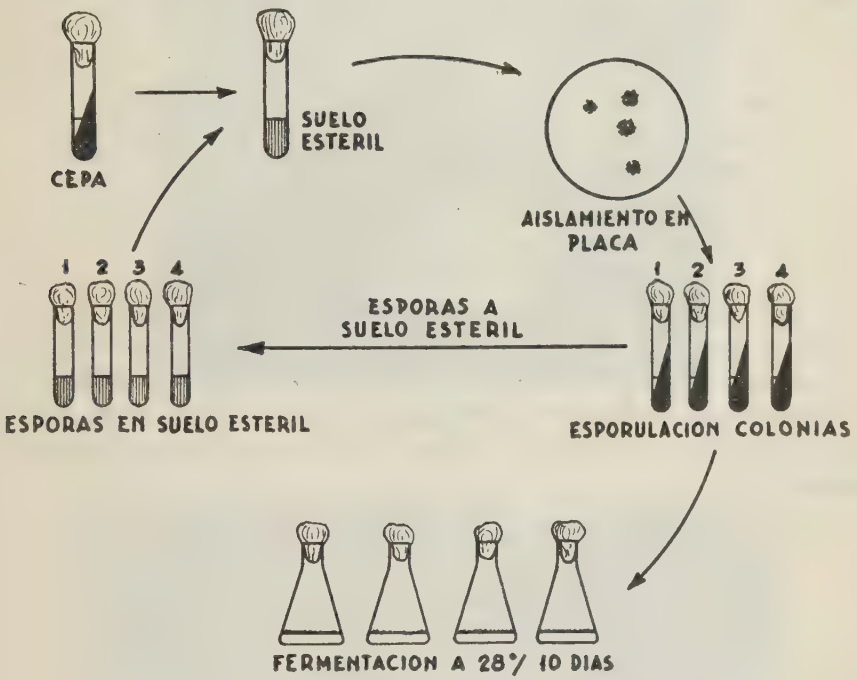


FIG. 2.

También con el mismo objeto se realiza la *inducción de mutaciones por rayos ultravioleta* (UV). Para esto se prepara una suspensión de esporas en cantidad de 4 millones/c. c. (contadas en cámara cuentaglóbulos), se pone en una placa de 10 cm. diámetro, 10 c. c. de suspensión, y se irradia (fig. 3).

Se emplea una lámpara Westinghouse de 4 watt., 118 vol., 0,82 amperios y 60 ciclos. La irradiación se hace en la oscuridad y con agitación. A intervalos de tiempo (0 a 150 minutos) se toma 1 c. c. e incorpora a 25 c. c. de medio de esporulación fundido a 45°, mezcla y pone en placa, incubando en oscuridad a 28° durante diez días. Se cuenta número de colonias desarrolladas y calcula el número de muertes comparadas con placas control. Se observa que a los ciento cincuenta minutos se produce un 99,88 por 100 de muertes. Se prueba la capacidad productora de las colonias mutantes.

El *medio de esporulación,* empleado en todos los tubos y placas de Petri en el presente trabajo, es el utilizado por Shu y Johnson (1947), cuya composición es la siguiente:

Sacarosa	14,00 %
Nitrato amónico	0,25 %
Fosfato monopotásico	0,10 %
Sulfato magnésico	0,025 %
Agar-agar	2,00 %

pH = 4,5 (con ácido clorhídrico).

Antes de añadir el agar se lava dos-tres veces con agua destilada, para separar posibles impurezas, a las que el hongo es muy sensible.

El *medio de fermentación* utilizado a lo largo de este trabajo es también el empleado por Shu y Johnson (1947), cuya composición es la siguiente:

Sacarosa	14,00 %
Nitrato amónico	0,25 %
Fosfato monopotásico	0,25 %
Sulfato magnésico	0,025 %

pH = 3,8 (con clorhídrico).

Este medio preparado con agua destilada es el «medio basal», sobre el que se estudia la influencia de los diferentes factores.

Respecto a la *técnica de fermentación,* todo el material empleado es lavado con mezcla crómica, agua corriente y agua destilada, secando en horno de esterilización. Se emplea 100 c. c. de medio en matraces de 1.000 c. c., se cubre la boca del matraz con una delgada capa de algo-

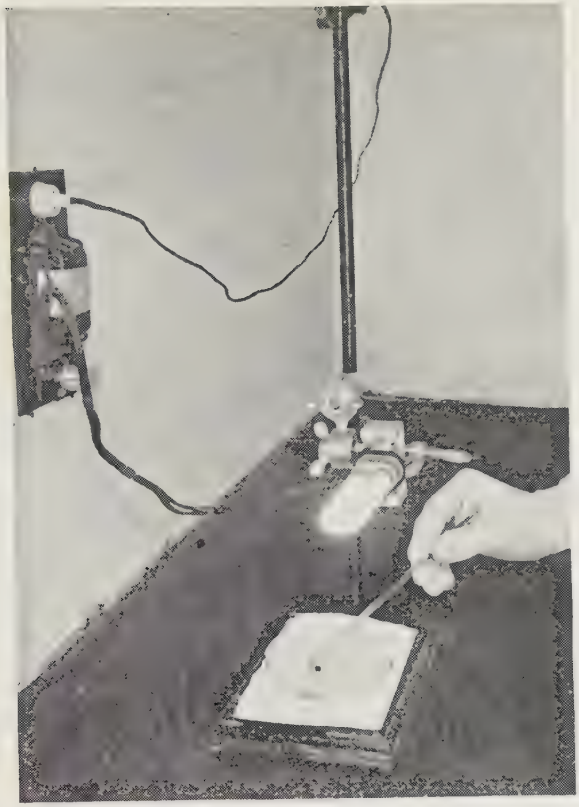


FIG. 3.

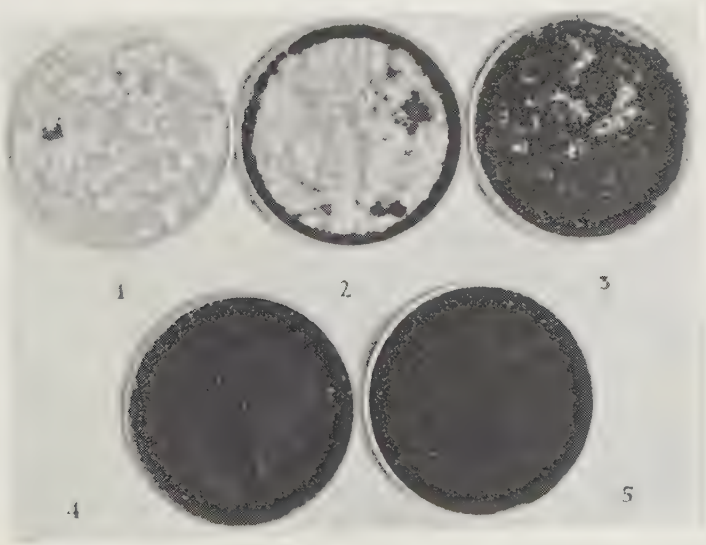


FIG. 4.

dón y gasa y se esteriliza treinta minutos a vapor fluente. Se inoculan con 2 c. c. de suspensión de esporas y se incuba a 28° por diez días.

Las características morfológicas que suelen presentar los cultivos superficiales, en cuanto al aspecto y esporulación (véase fig. 4), son las siguientes:

1.° Micelio escaso e incompleto superficialmente (blanco), no esporulado.

2.° Micelio abundante, bien desarrollado y arrugado, poca esporulación

3.° Idem, con esporulación incompleta.

4.° Micelio abundante y liso, esporulación abundante y completa.

5.° Idem, ídem.

Para estudiar los resultados obtenidos en las experiencias realizadas, se recurre a las *tomas de muestras* a los diez días. Se separa el micelio que se lava con agua destilada y deseca en estufa a peso constante. En el líquido de fermentación se toman las siguientes cantidades de muestra: 3 c. c. para determinar el pH, por medio de un modelo Beckman G, con electrodos externos; 1 c. c. para determinar el azúcar remanente en el medio por la técnica de Shaffer y Somogyi (1933), realizando la inversión de la sacarosa; 3 c. c. para determinar la acidez titulable por método que señalan Karow y Waksman (1947), con hidróxido sódico 0,25 N/ y fenoltaleína de indicador, calculan que 1 c. c. de NaOH 0,25 N/ equivale a 16 mgr. de ácido cítrico anhidro; el porcentaje de conversión de azúcar en cítrico, lo calculamos con la fórmula siguiente: % conversión = 100 . V . f/3.000, en la que V es el volumen de sosa gastado y f el factor de la misma. Por último, se emplean 5 c. c. para la determinación colorimétrica de ácido cítrico por medio de la técnica de Perlman y Lardy y Johnson (1944).

RESULTADOS

1. *Selección natural de razas de* Aspergillus niger *72-4.*

Por los métodos anteriormente indicados se aíslan 40 colonias de *Aspergillus niger,* las cuales se prueba su capacidad de producción de ácido cítrico por los métodos también previamente indicados. Se utiliza en todos los casos el medio de fermentación basal, al que se añade 25 gammas de zinc por cada 100 c. c. de medio.

Se observan grandes diferencias entre las diferentes razas en cuanto a la producción de ácido cítrico, el cual oscila, en cuanto a conversión, del 2,9 al 25,6 por 100. Para estudio separamos las que dan más de un 15 por 100 de conversión, y que son las siguientes:

Colonia núm.	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico / 100 cc. medio	% conversión
1	1,65	3,71 gr.	2.80 %	3.547 mgr.	25,3 %
2	1,55	3,00 »	5,80 %	2.399 »	17,1 %
4	1,55	2,76 »	5,50 %	2.347 »	16,7 %
5	1,55	3,02 »	5,00 %	2.712 »	19,3 %
7	1,60	2,51 »	6,40 %	2.347 »	16,7 %
11	1,75	2,31 »	6,20 %	2.290 »	16,3 %
12	1,55	2,15 »	4,90 %	3.382 »	24,1 %
13	1,55	2,35 »	3,50 %	3.592 »	25,6 %
14	1,70	2,28 »	5,10 %	2.238 »	15,9 %
15	1,75	2,57 »	5,20 %	2.551 »	18,2 %
17	1,65	2,80 »	4,00 %	2.665 »	19,0 %
21	1,70	2,37 »	6,60 %	2.134 »	15,2 %
22	1,60	2,23 »	6,90 %	2.342 »	16,7 %
27	1,70	2,08 »	6,20 %	2.603 »	18,5 %
31	1,75	2,30 »	7,40 %	2.238 »	15 9 %
35	1,65	2,18 »	8,20 %	2.290 »	16,3 %

Se observa que, salvo algunas excepciones, la producción de micelio (peso seco), o sea el crecimiento, es parecido en todas las razas; pero, en cambio, se observan variaciones en cuanto al consumo de azúcar, es decir, al azúcar que queda sin utilizar en el medio y que varía entre 2,80 y 8,20 por 100, existiendo alguna relación entre consumo de azúcar y producción de ácido cítrico.

En cuanto a la producción de dicho ácido, separamos las razas números 1 y 13, por ser las más productoras (+ 25 por 100).

2. *Inducción de mutaciones por ultravioleta del* Aspergillus niger *72-4.*

Por los métodos anteriormente indicados, aislamos cinco colonias de mutantes UV. de *Aspergillus niger,* las cuales se prueba su capacidad productora de ácido cítrico por los métodos también previamente indicados. En todos los casos se utiliza el medio de fermentación basal, al que se añade 25 gammas de zinc por cada 100 c. c. de medio. Los resultados de fermentación, a los diez días, son los siguientes:

Colonia núm.	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico / 100 cc. medio	% conversión
a	2,45	2,43 gr.	8,00 %	766 mgr.	5,4 %
b	2,15	2,47 »	5,70 %	1.040 »	7,4 %
c	2,30	2.48 »	6,90 %	821 »	5,8 %
d	2,25	2,40 »	6,40 %	821 »	5,8 %
e	2,20	2,27 »	7,40 %	821 »	5,8 %

Aunque el número de mutantes aislados es corto, sin embargo, por la uniformidad de sus resultados, puede deducirse que la irradiación UV. del *Aspergillus niger,* en las condiciones realizadas, no da lugar a la producción de razas buenas productoras, como es el caso de la selección natural.

Comparando unas razas con otras, observamos que la producción de micelio o crecimiento es parecido en los dos casos, siendo similares los caracteres morfológicos. En cambio, la utilización de azúcar es menor en los mutantes UV., así como la producción de ácido cítrico.

3. *Influencia de la temperatura en la conservación de esporas del* Aspergillus niger *72-4.*

Dos cultivos esporulados iguales de *Aspergillus niger* 72-4 se dejan durante quince días, uno en la nevera (5.°) y otro a temperatura ambiente (20.°), para ver si este factor tiene influencia en la fermentación, como afirmaron algunos autores, como Perlman (1949), para fermentación sumergida.

En primer lugar, los caracteres morfológicos de ambos cultivos, a los diez días de fermentación, son idénticos; en cuanto a los demás resultados, son éstos los siguientes:

T° conservación	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico / 100 cc. medio	% conversión
5°	2,30	0,52 gr.	12,20 %	468 mgr.	3,3 %
20°	2,20	0,64 »	10,80 %	468 »	3,3 %

Las esporas conservadas a temperatura ambiente dan una mayor cantidad de micelio y una mayor utilización de azúcar; pero como el cítrico producido es el mismo en los dos casos, se deduce que el exceso de azúcar utilizado lo es para formar más micelio.

4. *Influencia de los metales en el medio de esporulación.*

Shu y Johnson (1947) estudian este factor en la fermentación sumergida, lo cual nos sugiere a nosotros el hacerlo en esta parte de la fermentación superficial. Se realiza la fermentación por los métodos cono-

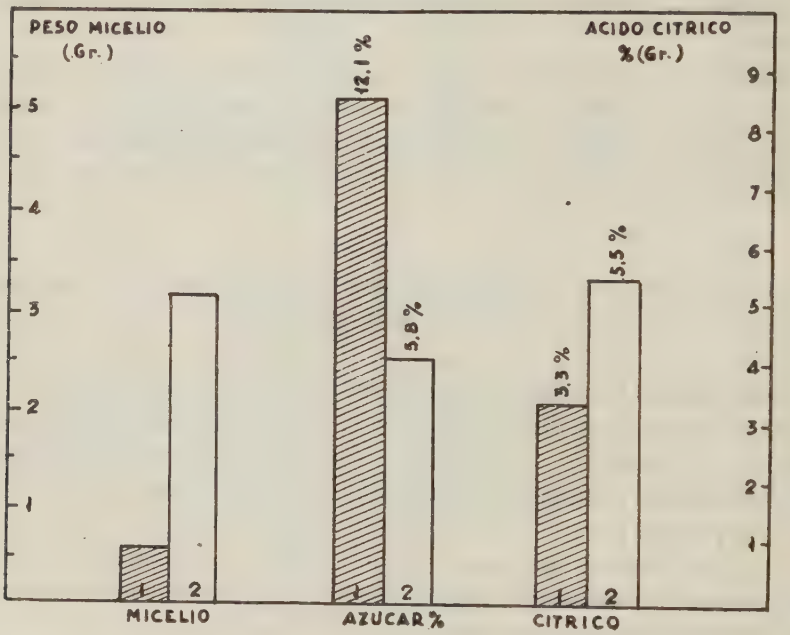


FIG. 5.

cidos y sembrando con suspensión de esporas, procedentes una de un medio de esporulación preparado tal como se indicó previamente, y otras del mismo medio de esporulación, al que se añadió por cada 100 c. c.: 25 γ de zinc, 6 γ de cobre, 130 γ de hierro y 10 γ de manganeso.

Los resultados, obtenidos a partir del medio de esporulación con me-

tales (1), y los del medio de esporulación sin ellos (2), se expresan en la figura 5.

En ella se observa que la fermentación, a partir de un medio de esporulación sin metales, da lugar a una mayor producción de micelio o crecimiento, una mayor utilización de azúcar y a superior producción de ácido cítrico. Estos resultados concuerdan en sus líneas generales con los obtenidos por Shu y Johnson (1947) para fermentación sumergida.

Una vez observada la influencia cualitativa de este factor, creemos necesario conocer si existe relación entre la cantidad de metales del medio de esporulación y los resultados de fermentación. Para esto se prepara una solución que contiene por centímetro cúbico: 25 γ de zinc, 6 γ de cobre, 130 γ de hierro, 10 γ de manganeso, añadiéndose en diferentes cantidades (0,0 a 1,0 c. c.) a 100 c. c. de medio de esporulación. Los resultados son los siguientes:

C. c. metales	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico / 100 cc. medio	% conversión
—	2,4	3,16 gr.	5,80 %	780 mgr.	5,5 %
0,1	2,2	0,61 »	11,50 %	572 »	4,0 %
0,2	2,1	0,64 »	11,40 %	572 »	4 0 %
0,3	2,1	0,66 »	11,30 %	572 »	4,0 %
0,4	2,2	0,60 »	12,60 %	572 »	4,0 %
0,5	2,0	0,81 »	11,60 %	520 »	3,7 %
0,6	2,1	0,71 »	12,20 %	520 »	3,7 %
0,7	2,2	0,66 »	12,40 %	676 »	4,8 %
0,8	2,2	0,58 »	12,50 %	572 »	4,0 %
0,9	2,2	0,60 »	12,20 %	520 »	3,7 %
1,0	2,2	0,61 »	12,10 %	468 »	3,3 %

Se observa que no hay diferencias apreciables entre los límites de 0,1 c. c. a 1,0 c. c. de metales, cuando se añaden al medio de esporulación, en cuanto a producción de micelio, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico.

5. *Influencia del lavado de esporas de* Aspergillus niger *72-4.*

Parece lógico suponer que si metales añadidos al medio de esporulación influyen en la fermentación, podrían dichos metales pasar al medio de fermentación con el agua de suspensión de las esporas, o bien la

influencia era debida a cambios en la estructura interna de la espora. Para resolver esto se recurre a lavar las esporar procedentes de un medio de esporulación con metales con agua destilada varias veces, probando luego su capacidad productora solas, en agua destilada o en aguas de lavado. Las pruebas son:

a = Esporas sin lavar.
b = Esporas lavadas + agua de primer lavado.
c = Esporas lavadas + agua de segundo lavado.
d = Esporas lavadas + agua de tercer lavado.
e = Esporas lavadas + agua destilada.

Esporas	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico / 100 cc. medio	% conversión
a	2,7	2,54 gr.	8,10 %	676 mgr.	4,8 %
b	2,5	2,35 »	7,40 %	676 »	5,0 %
c	2,6	2,53 »	8,00 %	780 »	5,5 %
d	2,6	2,14 »	7,00 %	624 »	4,4 %
e	2,6	2,21 »	8,30 %	676 »	4,8 %

Al no observarse grandes diferencias en los resultados anteriores, parece deducirse que la presencia de los metales en el medio de esporulación afecta a la estructura interna de la espora, lo que se traduce después en una diferencia de actividad en el medio de fermentación.

6. *Efecto de transferencia por medio de esporulación del* Aspergillus niger *72-4.*

Algunos autores han indicado que pases o transferencias del *Aspergillus niger* por medios de esporulación daba lugar a una pérdida de poder productor de ácido cítrico. Shu y Johnson (1947), a través de 18 transferencias por medio de esporulación, demuestran que esto no es verdad para la raza «72-4» en fermentación sumergida. Nosotros tratamos de ver esto a través de 31 transferencias de la raza «72-4» por medio de esporulación en fermentación superficial.

Como es lógico, en fermentación se prueba la influencia de las transferencias, y a su vez la de la edad de las esporas, que en la última trans-

ferencia viene a ser de siete meses. Los resultados en medio de fermentación basal, con 25 gammas de zinc por 100 c. c. de medio, son los siguientes:

Núm. transferencia	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico / 100 cc. medio	% conversión
1.ª	2,0	2,77 gr.	4,60 %	2.080 mgr.	14,8 %
5.ª	1,9	2,81 »	4,40 %	2.190 »	15,6 %
9.ª	2,0	2,85 »	4,80 %	2.135 »	15,2 %
11.ª	2,1	2,91 »	4,80 %	1.588 »	11,3 %
15.ª	2,0	2,93 »	4,30 %	1.752 »	12,5 %
19.ª	2,1	2,73 »	4,10 %	1.478 »	10,5 %
23.ª	2,3	2,78 »	4,90 %	1.368 »	9,7 %
27.ª	2,0	2,80 »	4,60 %	1.971 »	14,0 %
31.ª	2,0	2,82 »	3,70 %	2.245 »	16,0 %

No encontramos diferencias apreciables en cuanto a la cantidad de micelio o crecimiento, consumo de azúcar y producción de ácido cítrico a través de 31 transferencias o pases por medio de esporulación y con esporas de siete a doscientos diecisiete días de edad. Esto con la raza «72-4» y en fermentación superficial.

7. *Influencia de la esterilización en el medio de fermentación.*

Algunos autores señalan que, debido al pH tan bajo a que se realiza la fermentación cítrica, quizá pudiera suprimirse la fase de esterilización del medio de fermentación.

Quizá esto sería conveniente si al no esterilizar aumentaran los rendimientos en ácido cítrico; es por esto que realizamos una prueba para observar el efecto de la esterilización en el medio de fermentación y cuyos resultados se expresan en la figura 6.

Observamos que, aunque la cantidad de micelio o crecimiento es inferior en el medio esterilizado (1), comparado con el medio sin esterilizar (2), el consumo de azúcar y la producción de ácido cítrico son superiores en el medio estéril. Esto sugiere la producción durante la fase de esterilización de reacciones que dan lugar a la producción de sustancias que inhiben el crecimiento, pero que favorecen la producción de ácido cítrico.

8. *Influencia del enfriamiento del medio de fermentación.*

El medio de fermentación, después de esterilizar, se encuentra a una temperatura aproximada de 100°; antes de inocularlo pasa un período de tiempo para lograr su enfriamiento. Steel y Lentz y Martin (1955) di-

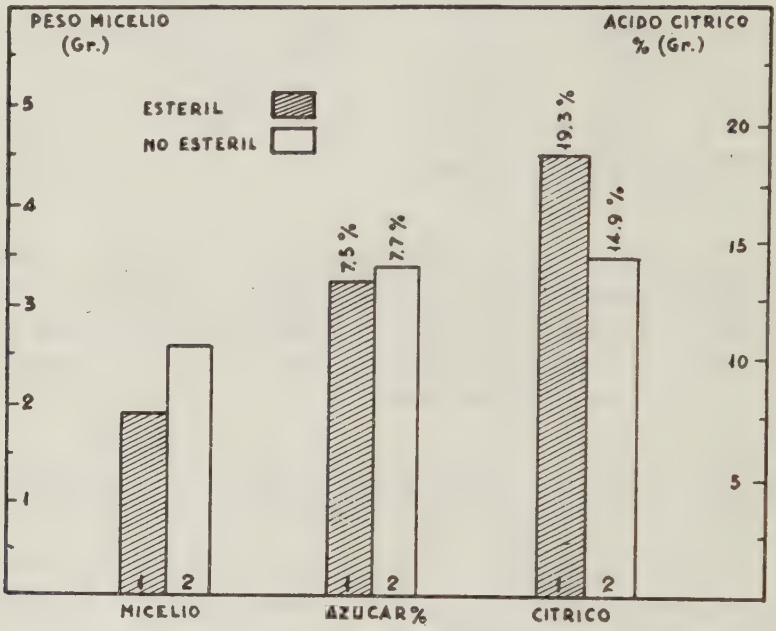


FIG. 6.

cen que este tiempo de enfriamiento influye en la fermentación cítrica sumergida. Nosotros probamos este factor en la fermentación superficial.

Utilizamos tres matraces con medio de fermentación basal iguales y sembrados con la misma suspensión y cantidad de esporas. Normalmente el tiempo de enfriamiento es de treinta minutos; esto se compara con otros dos matraces, enfriados, uno en quince minutos y otro inmediatamente por inmersión en agua fría. Los resultados son los siguientes:

Tiempo enfriamiento	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico / 100 cc. medio	% conversión
30′	1,75	1,99 gr.	7,50 %	2.712 mgr.	19,3 %
15′	1,90	2,26 »	7,40 %	2.399 »	17,1 %
0′	1,75	2,15 »	7,90 %	2.608 »	18,6 %

Al contrario de los resultados de los autores señalados, no encontramos diferencias apreciables, tanto en la cantidad de micelio como en el consumo de azúcar y producción de ácido cítrico, por influencia del tiempo de enfriamiento, después de la esterilización del medio de fermentación.

9. *Influencia de la relación área/volumen.*

Como se ha señalado en otra parte, la relación área/volumen es uno de los factores físicos que más afecta a la producción de ácido cítrico en superficie.

Para estudiar este factor dentro de las condiciones de fermentación por nosotros utilizadas, empleamos frascos de Roux de 1.000 c. c. de capacidad con medio de fermentación basal e inoculados con la misma suspensión y cantidad de esporas. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Mm. altura	C. c. medio	pH	Azúcar remanente	Cítrico / 100 cc. medio	% conversión
3,3	60	2,2	12,40 %	624 mgr.	4,4 %
5,0	90	2,2	11,10 %	676 »	4,8 %
6,6	120	2,1	11,50 %	780 »	5,5 %
8,3	150	2,2	11,60 %	728 »	5,2 %
10,0	180	2,1	11,20 %	728 »	5,2 %

Aunque con muy ligeras diferencias, observamos que existe un óptimo de relación área/volumen que corresponde a 120 c. c. de medio y a 6,6 mm. de altura, en lo que se refiere a producción de ácido cítrico.

10. *Influencia del azúcar del medio de fermentación.*

Se ha observado que en los trabajos de investigación de fermentación cítrica en medios sintéticos, unos autores utilizan sacarosa y otros emplean glucosa. Con objeto de probar cuál de los dos azúcares va mejor a nuestras condiciones de fermentación, realizamos esta experiencia, en la que la única variable es la fuente de carbono. Los resultados se expresan de la siguiente forma gráfica (fig. 7):

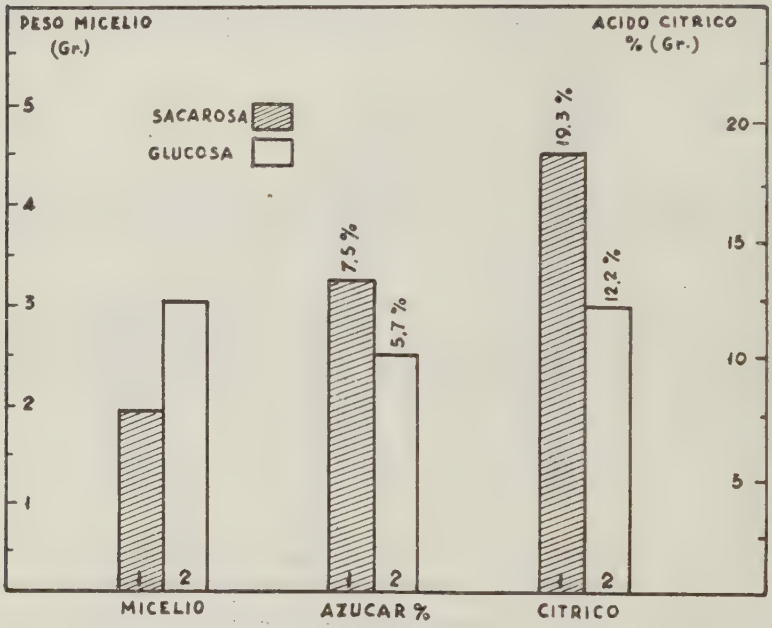


FIG. 7.

En ella se observa que, aunque la sacarosa da lugar a menos crecimiento o producción de micelio, y lógicamente a menor consumo de azúcar, sin embargo la producción de ácido cítrico es superior, lo cual indica que dentro del metabolismo del *Aspergillus niger* la sacarosa va a formar ácido cítrico y la glucosa a cooperar en el crecimiento.

DISCUSION

Antes de comenzar el estudio de los factores o variables que pueden influir en la producción de ácido cítrico en medios sintéticos y en fermentación superficial, debemos conseguir una raza de *Aspergillus niger* que, aparte su estabilidad, sea muy productora. Nosotros partimos de la raza «72-4», que reúne estas características, pero para mejorarlas y también para adaptarlas a las condiciones de nuestro laboratorio realizamos pruebas de selección natural y de obtención de mutantes por irradiación ultravioleta, separando para futuros trabajos las razas que nombramos números 1 y 13, que dan más de un 25 por 100 de ácido cítrico, aisladas por selección natural.

Se estudian, en primer lugar, algunos factores que se relacionan con el medio de esporulación y que ya fueron estudiados por otros autores en diferentes circunstancias. Estudiamos la influencia de la presencia de elementos metálicos y el efecto de las transferencias o pases por el medio de esporulación, de forma parecida a como lo realizaron Shu y Johnson (1947), y nuestros resultados en fermentación superficial corroboran los obtenidos por ellos en fermentación sumergida, es decir, que la presencia de metales en el medio de esporulación disminuye la producción de ácido cítrico, sin influir, según vemos nosotros, la cantidad de metales añadida dentro de ciertos límites, y también que ni los pases por medio de esporulación a través de 31 transferencias, ni la edad de las esporas, afectan sensiblemente a la producción de ácido cítrico en fermentación superficial.

Por el contrario, no encontramos influencia en la temperatura de conservación de las esporas, como observó Perlman (1949), para producir ácido cítrico, ni, como observaron Krishnan, Bajaj y Damle (1954), el lavado de las esporas influye en la producción. Esto último nos lleva a sugerir que la presencia de algunos elementos en el medio de esporulación afecta a la estructura interna de la espora.

Con relación a algunos factores utilizados en la preparación del medio de fermentación, encontramos que, al contrario de lo que podría suponerse, la esterilización del medio favorece la producción del ácido cítrico, en cambio no encontramos esta influencia en la temperatura y tiempo de enfriamiento, como afirman Steel y Lentz y Martin (1955), para fermentación sumergida. Con respecto a la relación área/volumen, fac-

tor fundamental en la fermentación superficial, vemos que el óptimo de profundidad observado por nosotros (6,6 cm.) está dentro de los límites señalados por otros autores.

Por último, en la duda del empleo en fermentación cítrica superficial de un medio sintético, de elegir entre la sacarosa o la glucosa como fuente de carbono, encontramos que el empleo de la sacarosa da lugar a una mayor producción de ácido cítrico, aunque su consumo sea más lento.

En todas y cada una de las experiencias que se realizan, la cantidad de ácido cítrico se determina por el método de acidez titulable; sin embargo, también se hacen determinaciones colorimétricas del ácido cítrico, las cuales dan los mismos resultados que la acidez titulable. Esto quiere decir que en todos los casos la acidez se debe totalmente al ácido cítrico.

RESUMEN

Se inicia un trabajo sobre producción de ácido cítrico por fermentación con razas seleccionadas por irradiación ultravioleta y selección natural del *Aspergillus niger* 72-4. Wis.

En este trabajo se prueba que en fermentación en superficie y en medios sintéticos la temperatura de conservación de las esporas, el lavado de las mismas, la transferencia a través de 31 pases y el tiempo de enfriamiento del medio estéril, no tienen influencia en la producción de ácido cítrico. En cambio, la presencia de metales en el medio de esporulación y la no esterilización del medio de fermentación, disminuyen tal producción.

En adición a los anteriores factores, el óptimo de altura del medio encontrado es de 6,6 cm. en lo relativo a la relación área/volumen, y el empleo de sacarosa, en vez de glucosa, en fermentación da mayor producción de ácido cítrico.

SUMMARY

The authors study the production of citric acid by fermentation with selectioned germs of *Aspergillus niger* 72-4. Wiss.

They describe the influence of different factors (temperature, sterilization, metals, saccharose, etc.) in the cultures of this microorganism.

BIBLIOGRAFIA

CURRIE, J. N. 1917. J. Biol. Chem. 31. 15
DOELGER, W. P., and PRESCOTT, S. C. 1934. In. Eng. Chem. 16, 1142.
FOSTER, J. W. 1949. Chemical Activities of Fungi, pág. 378-419.
KAROW, E O., and WAKSMAN, S. A. 1947. Ind. Eng. Chem. 39, 821.
KITOS, P. A.; CAMPBELL, J. J. R., and TOMLINSON, N. 1953. Appl. Microbiol, 1, 156.
KRISHNAN, P. S.; BAJAJ, V., and DAMLE, S. P. 1954. App.. Microbiol. 2, 303.
MARCILLA, J., y XANDRI, J. M. 1947. Microbiol. Españ. 1, 5.
PERLMAN, D. 1946. Arch. Biochem. II, 123.
PERLMAN, D. 1949. Proc. IV Cong. Intern. Microbiol. 546.
PERLMAN, D.; LARDY, H. A., and JOHNSON, M. J. 1944. Ind. Eng. Chem. 16, 515.
PRESCOTT, S. C., and DUNN, C. G. 1949. Industrial Microbiology, pág. 572-606.
SHAFFER, P. A., and SOMOGYI, M. 1933. J. Biol. Chem. 8, 127.
SHU, P., and JOHNSON, M. J. 1947. J. Bacteriol, 54, 161.
STEEL, R.; LENTZ, C. P., and MARTIN, S. M. 1955. Can. J. Microbiol. I, 299.
THOM, C., and RAPER, K. 1945. Manual of Aspergilli.
THOM, C., and CURRIE, J. N. 1916. J. Agr. Research, 7, I.
UNDERKOFLER, L. A., and HICKEY, R. J. 1954. Industrial Fermentations. Vol I.
WELLS, P. A., and HERRICK, H. T. 1938. Ind. Eng. Chem. 30, 255.

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS
SECCION DE BIOQUIMICA

OBTENCION DE UN «HIBRIDO ILEGITIMO» DE *SACCHAROMYCES DELBRUECKII*

POR

JUAN SANTA MARÍA

Trabajando sobre genética de levaduras, una de las técnicas que se sigue con determinadas especies, para lograr la haplofase, es aprovechar la diferencia existente entre las temperaturas mortales para la espora y para la célula vegetativa. Utilizando dicha técnica se ha obtenido con una raza de *Saccharomyces delbrueckii* un cultivo que, indudablemente, pertenece a los llamados por Lindegren (1) «híbridos ilegítimos».

METODOS

Cultivo empleado.—Se ha utilizado la raza VB11—1 de *Sacch. delbrueckii,* que tiene la particularidad de formar ascas con más de 4 esporas (11).

Medio de esporulación.—Se lograba la esporulación del cultivo, siguiendo la técnica ya descrita (12), en el medio de Kleyn (6).

Tratamiento térmico.—Las estrías del medio de esporulación se arrastraban con agua estéril a un matraz aforado estéril de 100 ml. Se tenía diez minutos en mesa de agitación y se completaba el volumen. De esta suspensión se ponían 2 ml. en tubos de 10 × 100 m., que se mantenían tiempos variables en baño maría a la temperatura del tratamiento.

Determinación del número de células.—El conteo total se hacía con cámara Thoma y las células viables por el método de las placas, utilizando agar de malta.

Control de la acción térmica.—Se comprobaba la mortalidad producida por el tratamiento térmico, por microscopía de fluorescencia (2), empleando el microscopio Ortholux (Leitz), con la lámpara Philips

CS 150, filtros BG 12 ó 4 mm. UG_1, filtro líquido de sol. al 3 por 100 de sulfato cúprico y filtros oculares OG 1 2,5 mm. o Euphos 2,5 mm., respectivamente.

Para hacer las preparaciones se empleaban cubre-objetos especiales sin fluorescencia. Las células se coloreaban con naranja de acridina Dembach al 1:5000 en agua destilada; las células muertas toman color rojizo naranja y las vivas verde (13). Se comprobó que era indiferente emplear el filtro BG 12 ó el 4 mm. UG_1, con sus respectivos filtros oculares.

Clasificación.—Se seguían los métodos y se empleaban los medios de Lodder y Kreger-van Rij (8) y Wickerham (14).

Germinación de esporas.—Para poder observar directamente y de modo continuo la forma de germinación de las ascosporas, se seguía la técnica siguiente: de la estría del medio de esporulación se hacía una suspensión en solución fisiológica, de la cual se esparce un asa sobre una capa de agar extendido sobre un portaobjetos esterilizado. Se cubría la zona con las células con un cubreobjetos esterilizado, y el conjunto se disponía sobre una platina calentable Biotherm (Reichert), que a su vez se adaptaba a la platina del microscopio Ortholux (Leitz). Las fotografías se hacían con el objeto de inmersión Apo 90:1 y el ocular Periplan 12 ×, con el dispositivo fotográfico Aristophot.

El agar empleado era agar nutritivo Difco con 5 por 100 de glucosa.

RESULTADOS

Se empleó una estría de *Sacch. delbrueckii raza* VB11-1, que llevaba quince días en el medio de esporulación de Kleyn a 25°. La concentración de la suspensión resultante era de $1,4 \times 10^6$ células totales por ml.

De esta suspensión se mantenían alícuotas de 2 ml., durante cinco, siete y ocho minutos en baño maría a temperatura de 57°.

Se determinaba el número de células viables, tanto de las suspensiones sometidas al choque térmico como de la suspensión inicial, que era el siguiente:

Suspensión original	750×10^3 células/ml.
Tratada 5 minutos a 57°	11×10^3 » »
» 7 » » »	$1,5 \times 10^3$ » »
» 8 » » »	$0,1 \times 10^3$ » »

El control con el microscopio de fluorescencia era menos concluyente, en cuanto a la determinación comparativa de la acción del tiempo. Sin embargo, es digno de mensión resaltar que se observaban ascas con ascosporas rojas y verdes, por ejemplo, un asca de 4 esporas con una roja y 3 verdes.

En las placas de conteo de siete minutos se observó, junto a las típicas colonias de *Sacch. delbrueckii* (foto 1), una colonia más pequeña. Se sembró de la misma en estría de agar de extracto de levadura-extracto de malta y se la designó como 7'—1, purificándole tres veces consecutivas.

Comparando este cultivo 7'—1 con el original VB11—1, tenemos:

Las estrías tienen distinto aspecto: 7'—1 tiene menos desarrollo, es menos cremosa y de un color menos blanco. Las colonias a los tres días en agar malta, son también más pequeñas y menos cremosas las de 7'1.

A los tres días en agar de extracto de levadura-extracto de malta, VB11—1 da células redondas y ovales cortas (11) de (2,75 — 5,5) × (4 — 7,2)μ; la relación entre longitud y anchura varía de 1,1 a 1,4. En las mismas condiciones 7'—1 da células menos refringentes; en cuanto a forma y tamaño, muchas recuerdan a las de VB11—1, pero en otras la relación entre longitud y anchura llega a 2. Las dimensiones extremas son prácticamente las mismas.

Después de cinco días de cultivo en portaobjetos con agar de patata Difco, ninguno de los dos cultivos forma pseudomicelio, ni en aerobiosis ni en anaerobiosis: únicamente un rudimento de pseudomicelio en aerobiosis (foto 2).

Fermentación: Ambos fermentan en dos días la glucosa y la galactosa. No fermentan, ni asimilan, sacarosa, maltosa o lactosa.

No asimilan el nitrato potásico.

Esporulación: VB11—1 esporula en diversos medios, y además en el de Kleyn forma ascas con 5, 6, 7 y 8 ascosporas (11) (foto 3). Por el contrario, 7'—1 no esporula en ningún medio.

Colonias gigantes: A las cuatro semanas en agar de extracto de levadura-extracto de malta a 17° las colonias gigantes que forma son completamente distintas (fotos 4 y 5). VB11—1 da una colonia circular blanca, umbonada, mate, de 13 mm. de diámetro, de bordes enteros, mientras que 7'—1 da una colonia festoneada, de unos 8 mm. de diámetro mayor, pulvinada, formada como por la unión de tres lóbulos distintos.

Germinación de las esporas de VB11—1: Siguiendo la técnica indi-

cada y partiendo de una estría en agar de Kleyn que llevaba veinticinco días de incubación a 25°, se observó la germinación de un asca con cuatro esporas. La germinación se produce sin romperse previamente las paredes del asca, conjugándose dos a dos las ascosporas (fotos 6 a 13).

DISCUSION

Según Phaff y Mrak (9, 10), fué Hansen (4) el primero que observó que existe una diferencia entre la célula vegetativa de las levaduras y la espora, en lo referente a la resistencia a las temperaturas elevadas. Las células vegetativas jóvenes de *Sacch. cerevisiae* se destruían en cinco minutos a 54°, y las esporas en cinco minutos a 62°. Esto fué confirmado poco años después por Kayser (5), que llegó a encontrar diferencias de 10 y 20° entre las temperaturas mortales para la espora y la célula vegetativa, aunque lo corriente era 5°.

Esta particularidad ha sido aprovechada para obtener cultivos haploides en levaduras que liberan la espora del asca antes de la germinación, como, por ejemplo, Wickerham (15) con *Hansenula.*

Hemos seguido esta técnica del tratamiento térmico para destruir las células vegetativas y no las ascosporas, con la raza VB11—1 de *Sacch delbrueckii,* aunque no libera las ascoporas dada la robustez de la pared del asca, como es corriente en la mayoría de las especies del género *Saccharomyces* (1), y aunque las esporas conjugan dentro del asca, sin formar células vegetativas haploides (fotos 6 a 13), cosa no desacostumbrada en dicho género (3, 8, 9, 10, 18).

Que el cultivo que hemos designado 7'—1 obtenido después del tratamiento térmico de siete minutos a 57° es distinto del original, no tiene duda, dada la forma de las células, el diferente aspecto en las estrías y colonias gigantes y la no esporulación de 7'—1. Ahora bien: el tamaño de las células, que es prácticamente el mismo en los dos cultivos, determina que no podamos pensar que 7'—1 representa la haplofase de VB11—1 (7, 16). No queda más alternativa que admitir que se trata de un «híbrido ilegítimo», según la hipótesis de los Lindegren (7), admitida prácticamente por Winge (17) con el gene D.

Esta hipótesis tiene también un firme apoyo en el hecho comprobado por microscopía de fluorescencia de la destrucción, dentro de una misma asca, de alguna espora y no de todas. Podemos, pues, suponer

que, dentro de ciertas ascas, sólo ha quedado una espora viable, que al germinar ha dado lugar a células vegetativas haploides, y que posteriormente han copulado entre sí dos del mismo tipo de apareamiento, *a* o *α*, o bien que, por ejemplo, dentro de un asca de cuatro esporas han quedado destruídas las dos que pertenecen al mismo tipo, y entonces han copulado las otras dos, dando lugar al «híbrido ilegítimo»; lo mismo puede suceder con las ascas de 3, 5 o más esporas.

Si los Lindegren (7) se releren a que los «híbridos ilegítimos» producen esporas no viables, en este caso particular no esporula.

En el desarrollo de este trabajo se ha contado con una ayuda de la «Fundación March». Agradezco a las señoritas Carmen Díaz Amado y María Alicia R. Corraliza la colaboración prestada en el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

Tratando un cultivo esporulado de *Sacchromyces delbrueckii*, raza VB11—1, en baño maría, 57° durante siete minutos, se ha obtenido un «híbrido ilegítimo», que se diferencia por la forma de las células, aspecto de las estrías y de las colonias gigantes, y que no forma esporas, mientras que mantiene la misma capacidad de fermentación y asimilación de los hidratos de carbono.

SUMMARY

An ilegitimate hybrid was as obtained by heating at 57°C. during seven minutes an sporulated culture of *Saccharomyces delbrueckii*, strain V B. II-1.

This hybrid is diferenciated by its cell morphology, giant colonies, and not forming spores. Whereas it mainteing the same fermentation and carbohydrates assimilation capacities.

BIBLIOGRAFIA

(1) Becze, G. I. de. 1956. A Microbiological Process Report. Yeasts I. Morphology. Appl. Microbiology 4, 1-12.

(2) Gottschewski, G. H. M. 1954. Die Methoden der Fluoreszenz- und Ultra-

violett-Mikroskopie und Spektroskopie in ihrer Bedeutung für die Zellforschung. Mikroskopie 9, 147-167.

(3) Guilliermond, A. 1920. The Yeasts. John Wiley & Sons New York.

(4) Hansen, E. 1883. Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. 2, 13.

(5) Kayser, E. 1889. Ann. Inst. Pasteur. 3, 513.

(6) Kleyn, J. G. 1954. A study of some environmental factors controlling sporulation of yeasts using a new sporulation medium. Vallerstein Lab. Comm. 17, 91-104.

(7) Lindegren, C. C. 1949. The Yeast Cell. Its Genetics and Cytology. Educational Publishers, In. Saint Louis.

(8) Lodder, J., and Kreger-van, Rij, N J. W. 1952. The Yeasts. A Taxonomic study. North-Holland Publishing Co. Amsterdam.

(9) Phaff, H. J.; Mrak, E. M. 1948. Sporulation in yeasts, Part I. Vallerstein Lab. Comm. 11, 261-279.

(10) Phaff, H. J.; Mrak, E. M. 1949. Sporulation in yeasts, Part II. Waqerstein Lab. Comm. 12, 29-44.

(11) Santa María, J. 1957. Sobre especies pluriesporuladas del género *Saccharomyces*. Bol. Inst. Nac. Inv. Agronómicas. 17, en prensa.

(12) Santa María, J. 1956. Un nuevo medio para la esporulación de las levaduras. An. Inst. Nac. Inv. Agronómicas, V. 171-182.

(13) Srugger, S. 1949. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. M. H. Schaper. Hannover.

(14) Wickerham, L. J. 1951. Taxonomy of Yeasts. U. S. Dept Agr. Technical Bulletin. Núm. 1.029.

(15) Wickerham, L. J.; Burton, K. A. 1954. A simple Technic for obtaining mating types in heterothallic diploid yeasts with special references to their uses in the genus *Hansenula*. J. Bacter. 67, 303-309.

(16) Winge, Ö. 1935. On haplophase and diplophase in some *Saccharomycetes*. Sompt rend. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol. 21, 77-112.

(17) Winge, Ö. 1952. The basis for the present position of yeast genetics. Vallerstein Lab. Comm. 15, 21-44.

(18) Winge, Ö.; Laustsen, O. 1937. On two types of spore germination, and on genetic segregations in *Saccharomyces*, demonstrated through single-spore cultures. Compt. rend. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol. 22, 99-107.

FOTO 1.—Colonia sumergida de *Saccharomyces delbrueckii* VB11-1 en agar de extracto de levadura-extracto de malta a los dos días a 25°. 7 x.

FOTO 2.—*Sacch. delbrueckii* VB11-1. Cultivo en porta-objetos según la técnica de Rivalier-Seydel, sobre agar patata a los cinco días a 25°. 250 x.

FOTO 3.—*Sacch. delbrueckii* VB11-1. Ascas con 1, 2, 3, 4 y 5 ascosporas. De medio de Kleyn después de diecisiete días a 17°. Sin colorear. 1.550 x.

FOTO 4.—*Colonia de Sacch. delbrueckii* VB11-1 en agar de extracto de levadura-extracto de malta a las cuatro semanas a 17°. 2 x.

FOTO 5.—Colonia del «híbrido ilegítimo» 7'-1 de *Sacch. delbrueckii* VB11-1, en agar de extracto de levadura-extracto de malta a las cuatro semanas a 17°. 2 x.

FOTOS 6 a 13.—Germinación de las 4 ascosporas de un asca de *Sacch. delbrueckii* VB11-1. Cultivo de porta-objetos en agar nutritivo Difco con 5 por 100 de glucosa, sobre platina caliente Biotherm a 25°. 1.950 x.

6.—A los treinta minutos de pasar el asca del medio de esporulación al agar nutritivo.

7.—A las cuatro horas treinta minutos.

8.—A las cinco horas treinta minutos.

9.—A las seis horas.

10.—A las seis horas treinta minutos.

11.—A las siete horas treinta minutos.

12.—A las ocho horas treinta minutos.

FOTO 13.—A las nueve horas treinta minutos.

Foto 1.

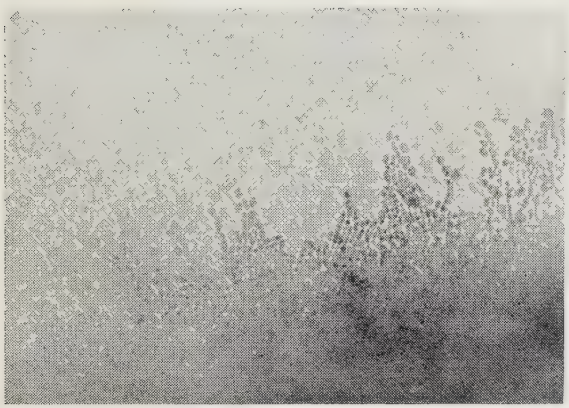


Foto 2.

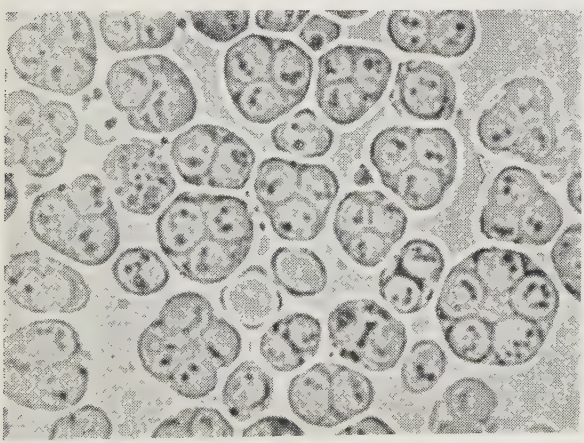


Foto 3.

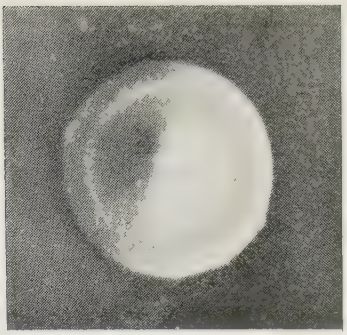


Foto 4.

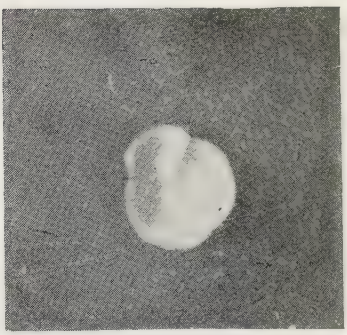


Foto 5.

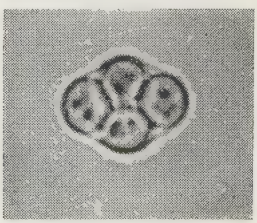


Foto 6.

Foto 7.

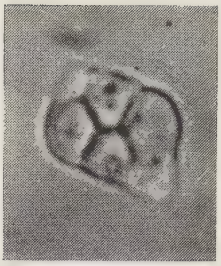


Foto 8.

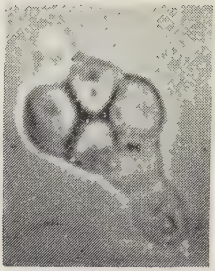


Foto 9.

Foto 10.

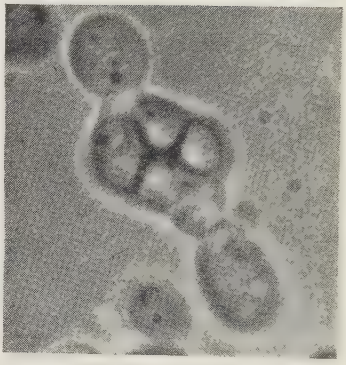


Foto 11.

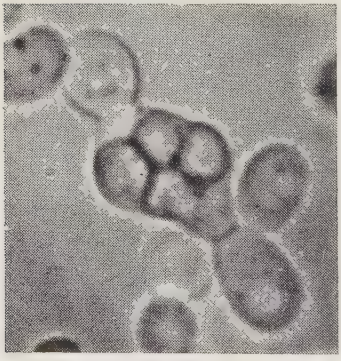


Foto 12.

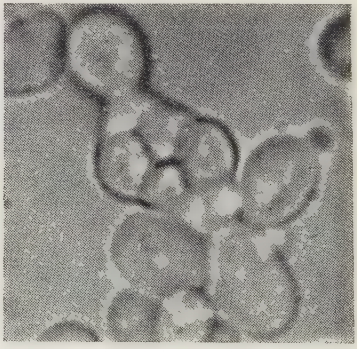


Foto 13.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN" DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE METABOLISMO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS DE LAS BACTERIAS

I. Relación entre crecimiento y contenido en ácidos nucleicos de bacterias en caldo común

POR

RAMONA VAAMONDE FERNÁNDEZ y BENITO REGUEIRO VARELA

INTRODUCCION

Los ácidos nucleicos son sustancias de fundamental importancia en en la vida y la constitución de todas las células. Presentes en el núcleo y en el citoplasma de todas las células, participan respectivamente en la constitución de los cromosomas y los genes y en el metabolismo celular. Esta importancia aumenta al pasar de las células superiores a los microorganismos, debido a que entran en mayor proporción en su constitución.

De las investigaciones realizadas por nosotros sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos de las bacterias, estudiamos en este primero el contenido en ácidos nucleicos de algunas bacterias en diferentes fases de crecimiento, cuando éste ocurre en un medio de caldo común. Se estudian las condiciones de crecimiento y la influencia de la temperatura en este contenido.

Antes de penetrar en la parte experimental de este trabajo, interesa conocer los trabajos anteriores sobre esta cuestión.

REVISION HISTORICA

El descubrimiento de los ácidos nucleicos se debe al fundador de la química del núcleo de la célula: Friedich Miescher (1844-1895).

A partir de los núcleos de las células (pus de heridas), obtuvo un compuestos, al que llamó «nucleína», que era de naturaleza ácida, soluble en álcalis, insoluble en ácidos y con gran cantidad de fósforo, lo cual llamó la atención, debido a que hasta entonces la única sustancia orgánica de los tejidos, que contenía fósforo, era la lecitina. La primera referencia bibliográfica sobre ácidos nucleicos es de F. Miescher (1871).

Realiza Miescher muchos trabajos sobre estas sustancias, siendo recopilados todos por sus alumnos en dos volúmenes, con el nombre «Die histochemischem und physiologischem Arbeiten von Friedich Miescher» (1897), Leipzig.

De los alumnos del autor citado, que continúan sus trabajos, desarrollando nuevas técnicas e investigando más a fondo estas sustancias Altman (1889), fué el primero que aplicó el término «ácido nucleico» y el primero en desarrollar métodos de preparación de estos ácidos a partir de tejidos animales y de levaduras.

A partir de este tiempo, varios laboratorios se especializaron en este terreno, siendo los que han realizado trabajos fundamentales sobre estas sustancias los de: Kossel, en Basilea (Suiza); Jones, en Baltimore (Estados Unidos); Levene, en Nueva York (Estados Unidos); Hammerstein, en Estocolmo (Suecia); Gulland, en Nottingham (Inglaterra); y otros.

Numerosísimos son los trabajos realizados desde diferentes puntos de vista sobre los ácidos nucleicos. Nosotros sólo haremos referencia a los que pueden tener alguna relación con nuestro trabajo. También son varios los libros escritos sobre este tema, siendo el primero de ellos y el más clásico el de Levene y Bass (1931), y el último y más extenso el de Chargaff y Davindson (1955), al que consideramos como nuestra principal fuente bibliográfica de ácidos nucleicos en general.

Tipos de ácidos nucleicos.

Es a partir de 1930, que puede señalarse ya una diferencia entre dos tipos de ácidos nucleicos: el ribonucleico (RNA) y el deoxiribonucleico (DNA). Al principio se creyó que sólo existían en el núcleo de la célula, y también se creyó que el ribonucleico era característico de las células vegetales. Hoy día puede afirmarse que ambos tipos de ácidos nucleicos se encuentran en todas las células vegetales o animales, siendo la más importante diferencia biológica entre ambos ácidos el que el

ribonucleico es, sobre todo, citoplasmático, y el deoxiribonucleico es sobre todo nuclear.

Aparte los dos mencionados tipos de ácidos nucleicos, Chargaff (1950) ha demostrado que existen variantes de ambos tipos diferentes en la composición y proporción de los componentes.

El ácido ribonucleico (RNA) por hidrólisis produce: adenina, guanina, citosina, uracilo, ácido fosfórico y un azúcar que Levene y Jacobs (1909) dicen ser ribosa. El ácido deoxiribonucleico (DNA), por hidrólisis, da lugar a la separación de: adenina, guanina, citosina, timina, ácido fosfórico y un azúcar que Levene, Mikeska y Mori (1930) dicen ser desoxirribosa.

Desde un punto de vista general, estas sustancias forman parte de unas macro-moléculas en las que el ácido nucleico se encuentra unido a una proteína formando las nucleoproteínas. Estas se encuentran en todas las células vivas, desde los virus a las células vegetales y animales.

En las mencionadas macro-moléculas nosotros sólo fijamos atención en la parte de ácido nucleico. Este se encuentra en forma de cadenas, cuya unidad fundamental es el tetra-nucleótido, formado por cuatro moléculas de ácido fosfórico, cuatro moléculas de azúcar y cuatro de las bases purinas y pirimidinas. De aquí se deriva que el tetra-nucleótido se compone de cuatro mono-nucleótidos, que, según la base de que se compone, reciben el nombre de: ácidos adenílico, guanílico, uridílico, citídico y timidílico, que se separan por hidrólisis alcalina. Si al nucleótido se le separa el ácido fosfórico, da lugar al nucleósido, los cuales son: adenosina, guanosina, uridina, citidina, timidina. Estos, finalmente, dan lugar a los azúcares y a las bases que antes hemos mencionado.

Aislamiento y determinación de ácidos nucleicos.

Cuando se trata de estudiar la constitución y estructura de un compuesto biológico complejo, es necesario hacerlo en varias fases.

Lo primero que hay que hacer es que la tal sustancia debe separarse de otras parecidas, y después deben reconocerse cualitativamente sus componentes. De aquí que las fases de estudio de estas sustancias son dos: aislamiento y determinación.

La determinación de un ácido nucleico puro es relativamente fácil, pues existen reacciones específicas de algunos de sus componentes. La dificultad empieza cuando se encuentran con otras sustancias, las cuales

es preciso separar. De los muchos métodos empleados para la determinación de ácidos nucleicos, nosotros nos fijamos en los métodos químicos De éstos, hasta la aparición de los de Schmidt y Thannhauser (1945) y Schneider (1945), ninguno fué completamente satisfactorio.

Una vez tengamos un buen método de separación de los ácidos nucleicos, como son los dos señalados, la determinación de los mismos es relativamente sencilla, por reacciones específicas de los componentes, como, por ejemplo, determinando el fósforo, la ribosa, deoxiribosa, etc.

La aplicación de la técnica de cromatografía de papel, por Vischer y Chargaff (1947), para separar y determinar las bases de los ácidos nucleicos, así como la introducción de la técnica de las resinas de intercambio iónico, aumentó grandemente el conocimiento de los ácidos nucleicos.

Acidos nucleicos en bacterias.

Comparados con los ácidos nucleicos de las células vegetales y animales, los de las bacterias son más difíciles de estudiar, por poseer partes menos definidas y, por tanto, más difíciles de obtener con un cierto grado de pureza.

Hasta el año 1947 nada o casi nada se había investigado en los ácidos nucleicos de las bacterias, siendo a partir de esta fecha cuando algunos laboratorios bacteriológicos se interesan en este tema, sobre todo desde que Avery y sus colaboradores (1944) demostraron la importancia del ácido deoxiribonucleico en la inducción de transformaciones bacterianas.

De todas formas, antes de 1947 se habían realizado algunos trabajos sobre nucleoproteínas y ácidos nucleicos de bacterias, como los de: Stoklasa (1908), Heidelberger (1925), Heidelberger y Kendall (1931), Thomson y Dubos (1938), Brown y Johnson (1922), Coghill (1932), Akari (1938), Sevag, Laskman y Smolens (1938) (1940), Petrick (1944) (1946), Coghill (1931), Schafer (1932). Sin embargo, es a partir de 1947, después del desarrollo de las técnicas de Schmidt y Thannhauser (1945) y Schneider (1945), cuando se inicia el estudio intensivo de los ácidos nucleicos de las bacterias.

De esta época son los trabajos de Belozersky (1947), Chargaff (1947) y Stacey (1947), los cuales afirman que los ácidos nucleicos se encuentran en todos los microorganismos, aunque en proporciones variables que dependen de la especie y la edad de la misma. El primer autor dice

que la gran cantidad de ácidos nucleicos pueda ser la causa de la gran vitalidad de las bacterias, lo que se ve por su rápido metabolismo, reproducción y poder de adaptación. Da las cantidades siguientes de ácidos nucleicos en peso seco para diferentes edades del *Escherichia coli:* 22,43 por 100 (cinco horas), 14,13 por 100 (veinte horas», 9,66 por 100 (cuarenta y ocho horas).

Muy imporante es el trabajo llevado a cabo por Boivin, Vendrely y Tulasne (1947), los cuales observan que no hay correlación entre el contenido en ácidos nucleicos y otras propiedades de las bacterias (metabolismo, antigenidad, virulencia, etc.). Dicen que el DNA se encuentra en el núcleo en cantidad de 3-4 por 100 (peso seco) y el RNA, en el citoplasma, en cantidad de 5-15 por 100 (peso seco). Estos autores emplean la técnica de Schneider para el aislamiento y las reacciones de azúcares (orcinol y difenilamina), para la determinación. Contenido en cultivos de veinticuatro horas a 37° de *Escherichia coli* son: 3,8-4,4 por 100 de DNA (peso seco) y 8,4-9,7 por 100 de RNA (peso seco). Bacterias aerobias esporuladas dan menor cantidad.

Otros trabajos más recientes son los de Chargaff y Saidel (1949), Jones (1951), Smith y Wyatt (1951), Schneider (1951), Zamenhoff y colaboradores (1952), Gandelman, Zamenhoff y Chargaff (1952), Zamenhoff, Brawerman y Chargaff (1952), Parsons Jr. (1953), Dernheimer (1953), Jones (1953), Khouvine, Barbier y Wysman (1953), Vischer, Zamenhoff y Chargaff (1949).

Es también de interés el trabajo de Mitchel (1950), que da un método de determinación directo de ácidos nucleicos en suspensiones bacterianas, midiendo la adsorción de las bases purina-pirimidina del *M. pyogenes* en espectrofotómetro. También son de interés los trabajos de Sherratt y Thomas (1953) y Reddi y Watson (1954).

Metabolismo de ácidos nucleicos de bacterias.

Siendo éste el objetivo del presente trabajo, interesa revisar la bibliografía sobre dicho metabolismo. Algunos autores estudian los ácidos nucleicos en relación con la virulencia de los gérmenes, como Overend, Stacey y Webb (1951) y Bennett y Williams (1954). Otros como Smolens y Vogt (1953), en relación con el fenómeno de resistencia a los antibióticos. Otros como Wellerson (Jr.) y Tetrault (1955), estudian el efecto de la temperatura en su producción. Kelner (1953) estudió el efec-

to de las radiaciones ultravioleta en la síntesis de los ácidos nucleicos.

Mitchell y Moyle (1951) estudian la relación entre el crecimiento, propiedades superficiales y contenido en ácidos nucleicos del *M. pyogenes*. Fitz-James (1954) estudia los ácidos nucleicos de las esporas de algunos bacilos esporulados. Encuentra que el RNA de las esporas de *Bacillus cereus* contienen un 50 por 100 de fósforo; en cambio, las de *Bacillus megatherium* tienen sólo un 25 por 100. En las formas vegetativas hay más cantidad. Newton, Wilson y Wilson (1955) estudian la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos en *Brucella* con carbono radioactivo, y Mitchell y Moyle (1953, 1954) siguen la incorporación del fósforo radioactivo a varias fracciones de la célula, viendo que el RNA se forma a partir de los nucleótidos que proceden del fósforo orgánico y el DNA del fósforo inorgánico.

Levy, Skutch y Schade (1949) estudian el metabolismo del fósforo de los ácidos nucleicos del *Proteus vulgaris*, y lo mismo que Malmgren y Heyden (1947), observan correlación entre contenido ácidos nucleicos, proteínas y número de células. A un aumento rápido de peso seco y turbidez, observan que el DNA varía muy poco; en cambio, el RNA aumenta rápidamente hasta 2,5 veces su valor inicial y luego disminuye. Las curvas de crecimiento y de contenido en RNA, cuando se comparan, son casi paralelas.

El metabolismo de los ácidos nucleicos del *Escherichia coli* es estudiado por varios autores. Borex, Ryan y Rickenback (1955) lo hacen en relación con el fenómeno de lisogenidad. Con fósforo radioactivo trabajan Morse y Carter (1949), Labaw, Mosley y Wyckroff (1950) y Wade (1952), encontrando que el 85 por 100 se encuentra después en los ácidos nucleicos y el 12 por 100 en los fosfolípidos. El fósforo aumenta durante la fase estacionaria de crecimiento y principio de la fase lag, disminuyendo después rápidamente; esto pasa también al RNA. La máxima cantidad de RNA y de DNA se forma antes de la multiplicación del germen, siendo la relación de que si el RNA aumenta de cinco a diez veces, el DNA aumenta dos veces.

Las síntesis de los ácidos nucleicos en el *Escherichia coli* es estudiada por Siminovitch y Graham (1954, 1956), Maruyama (1956) y Pardee y Prestidge (1956).

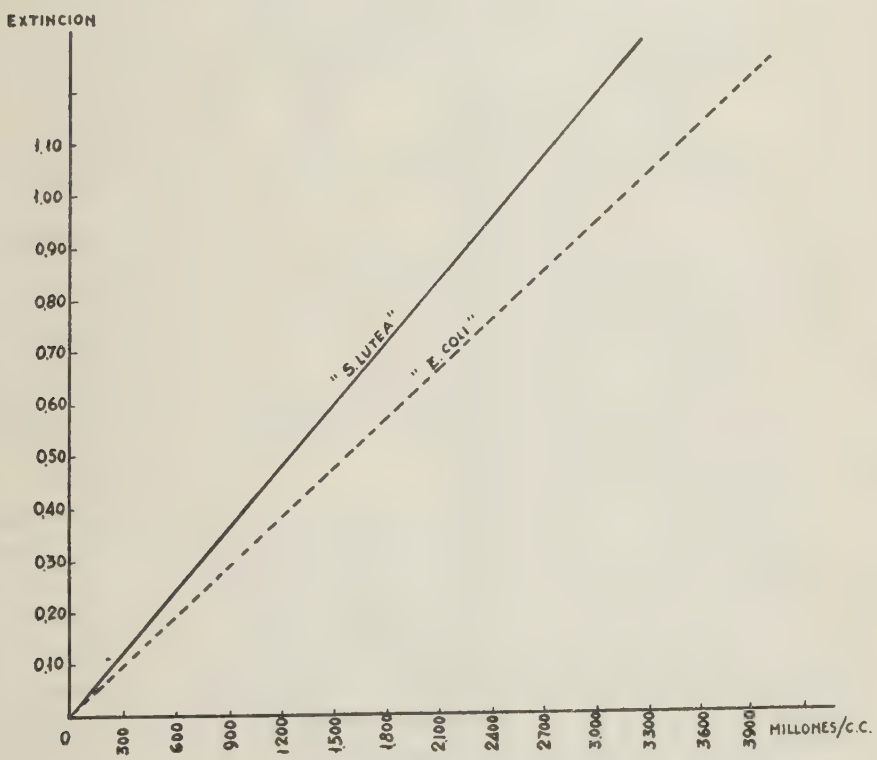
Por último, en relación con el metabolismo de los ácidos nucleicos en el *Escherichia coli*, Wade y Morgan (1957) observan que muchas bacterias contienen más RNA en crecimiento que en reposo.

Los ácidos nucleicos de *Sarcina lutea* son estudiados por Dutta, Jones y Stacey (1953, 1956). Hacen determinaciones en fases: lag (siete-ocho horas), logarítmica (cuarenta y ocho horas) y estacionaria (noventa horas).

Estos son los principales trabajos que pueden tener relación con nuestras investigaciones, y cuyos datos comparativos veremos más adelante.

METODOS Y TECNICAS

En estos trabajos utilizamos como gérmenes de estudio el *Escherichia coli* y la *Sarcina lutea*. Ocasionalmente también hemos empleado el *Bacillus subtilis*. Todos estos gérmenes se cultivan a partir de tubos de agar-caldo a 37° por veinticuatro horas.



GRÁFICA 1.

Todas las experiencias del presente trabajo se realizaron en medio de caldo común (extracto carne Bovril, al 0,5 por 100; peptona Whitte, al 2 por 100; cloruro sódico, al 0,5 por 100), a pH 7,4. Se reparte en cantidades de 100 c. c. en matraces de 500 c. c., que se esterilizan a 120° por treinta minutos.

Estos matraces se siembran con un centímetro cúbico de una suspensión, preparada por adición de 5 c. c. de solución salina a un tubo de agar-caldo; esta suspensión se diluye a una turbidez de 70, en fotocolorímetro Kipp, con filtro 55.

Estos matraces sembrados se ponen en diferentes condiciones de crecimiento, ya en estufa a 37°, o bien en agitación a 28° (en este último caso se utiliza un agitador de vaivén que da 90 oscilaciones por minuto con un recorrido de 10 cm.).

Se toman muestras a intervalos de tiempo y se determina la turbidez en la forma antes indicada, construyendo una curva de crecimiento en función de la extinción. Si se determina número de gérmenes en una cámara cuentaglóbulos de turbideces conocidas, se puede construir una gráfica, en la cual la extinción nos da el número de gérmenes (gráfica 12).

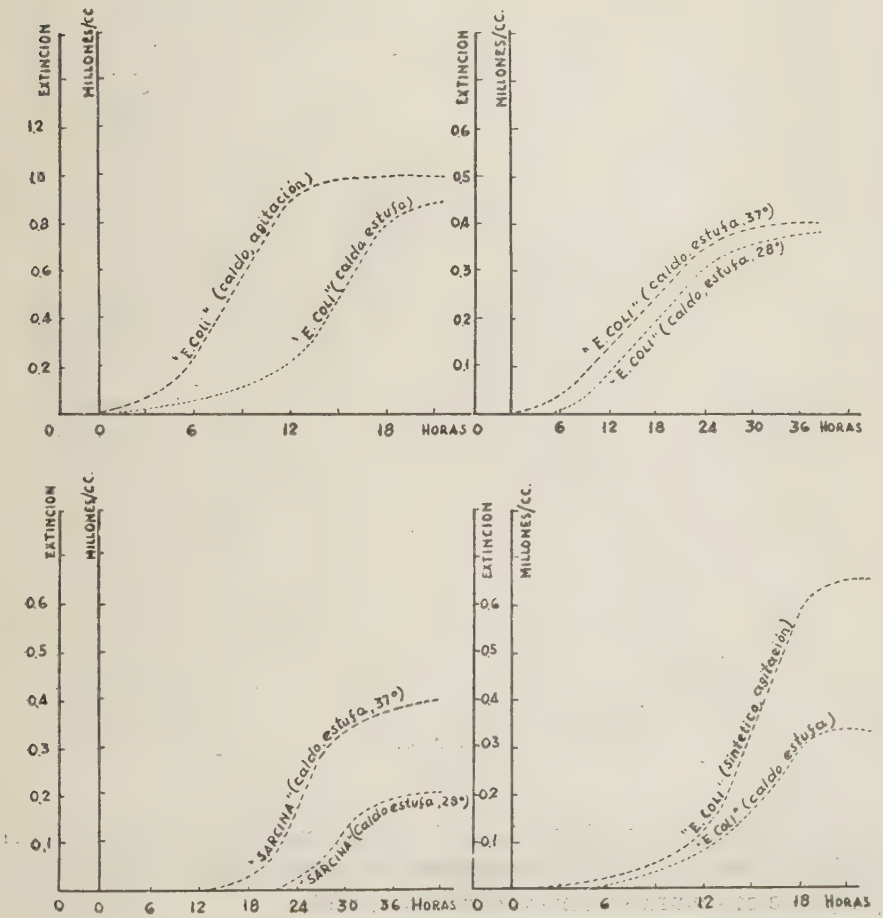
Ejemplos de curvas de crecimiento de *Escherichia coli* y *Sarcina lutea* en diferentes condiciones de crecimiento pueden verse en la gráfica 2.

Para el tratamiento de los gérmenes con objeto de obtener los ácidos nucleicos, se parte de una cantidad determinada y desecados. De los varios métodos que existen, se recurre al de deshidratación de las bacterias por solventes miscibles en agua. Para esto el cultivo de la bacteria se centrifuga y lava con agua destilada varias veces, se añaden al sedimento 10 volúmenes de acetona fría, centrífuga, el residuo se suspende en tres volúmenes de éter frío, se centrifuga, decanta y el residuo pone en desecador de vacío.

A continuación se realiza el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de los anteriores gérmenes desecados. Como dijimos anteriormente, hasta la aparición de los métodos de Schmidt y Thannhauser (1945) y de Schneider (1945), no existen métodos positivos de aislamiento de ácidos nucleicos de materiales biológicos. Después de ellos, todos los que aparecen son modificaciones más a menos afortunadas. Los dos métodos, por otra parte, son muy parecidos, en los dos hay una extracción preliminar de compuestos ácido solubles y lípidos, y se diferencian en que los primeros hacen una digestión alcalina que separa los ácidos nu-

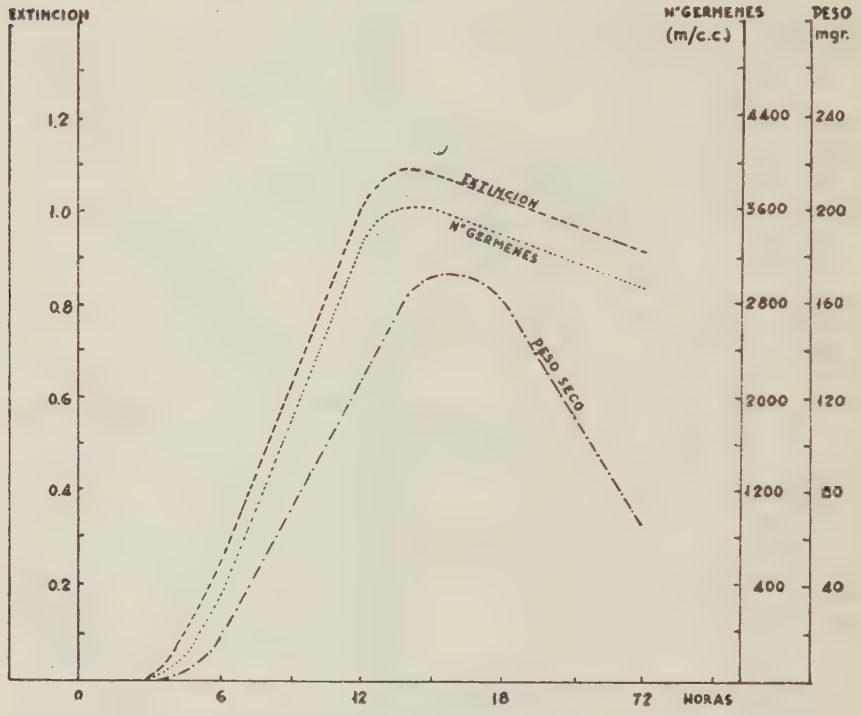
cleicos solubilizados, mientras que el segundo los extrae con ácido tricloracético o perclórico en caliente. Nosotros empleamos el primer método, modificado por Sherrat y Jones (1953), y por nosotros se realiza de la forma siguiente:

Una cantidad pesada de gérmenes desecados se mezcla con 5 c. c. de ácido tricloracético (ATC) frío al 10 por 100, en un tubo de centrifuga de 25 c. c. Se centrifuga a 4.500 rpm. durante treinta minutos, se repite la operación. El precipitado se mezcla ahora con 5 c. c. de etanol al 80



GRÁFICA 2.

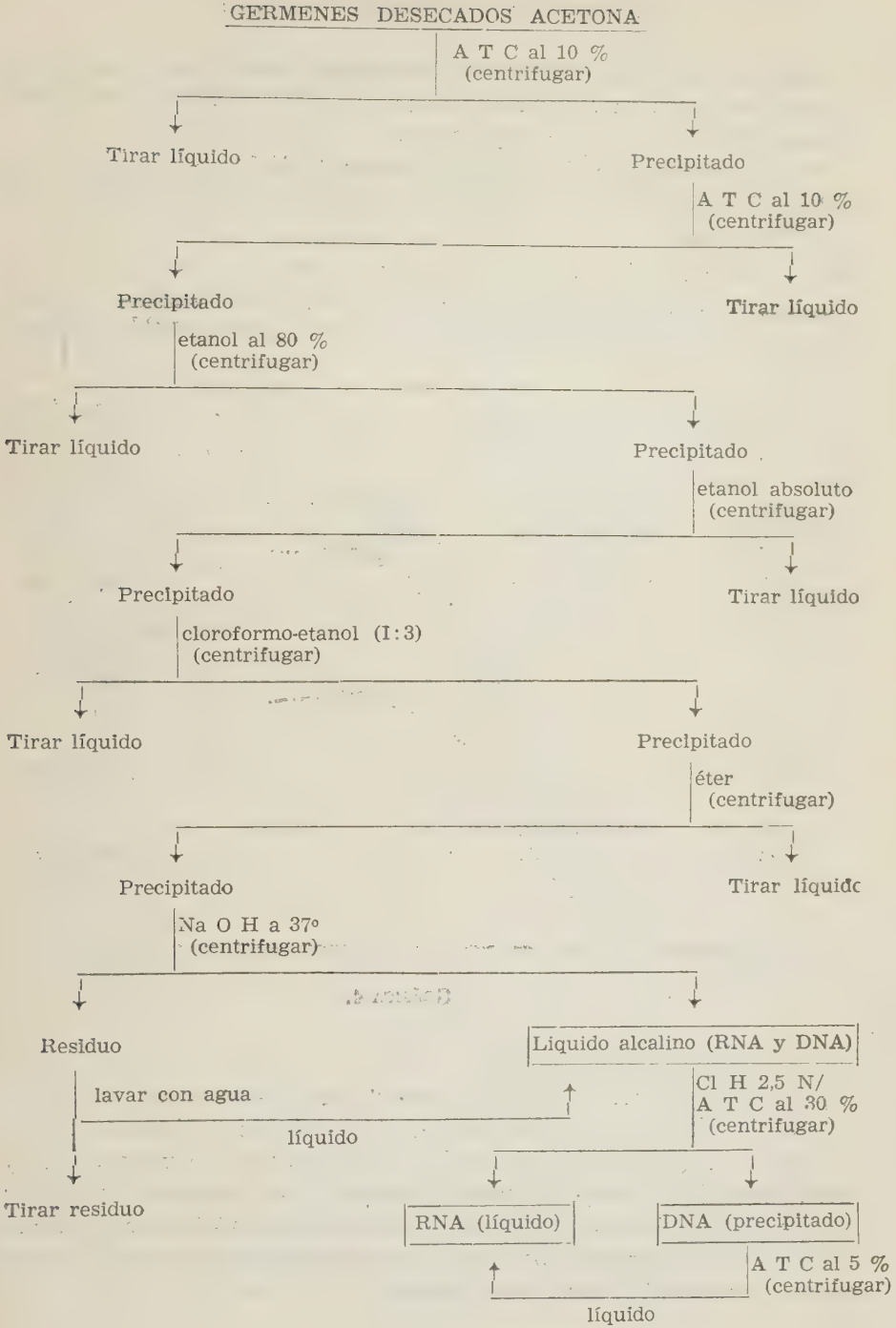
por 100 y se centrifuga de nuevo, se repite la operación con etanol absoluto, el precipitado se extrae dos veces con una mezcla de cloroformo-etanol al 1/3 y a 80°. Finalmente se extrae con éter. El residuo trata ahora con 3 a 10 c. c. de sosa N/ a 37° durante doce horas, se centrifuga, lava el residuo con agua destilada dos veces y se reúnen todos los líquidos donde van solubilizados los ácidos nucleicos totales. Para separarlos el líquido se neutraliza con ácido clorhídrico 2,5 N/ y se añade ATC al 30 por 100, precipitándose de esta manera el ácido deoxiribonucleico,



Gráfica 3.

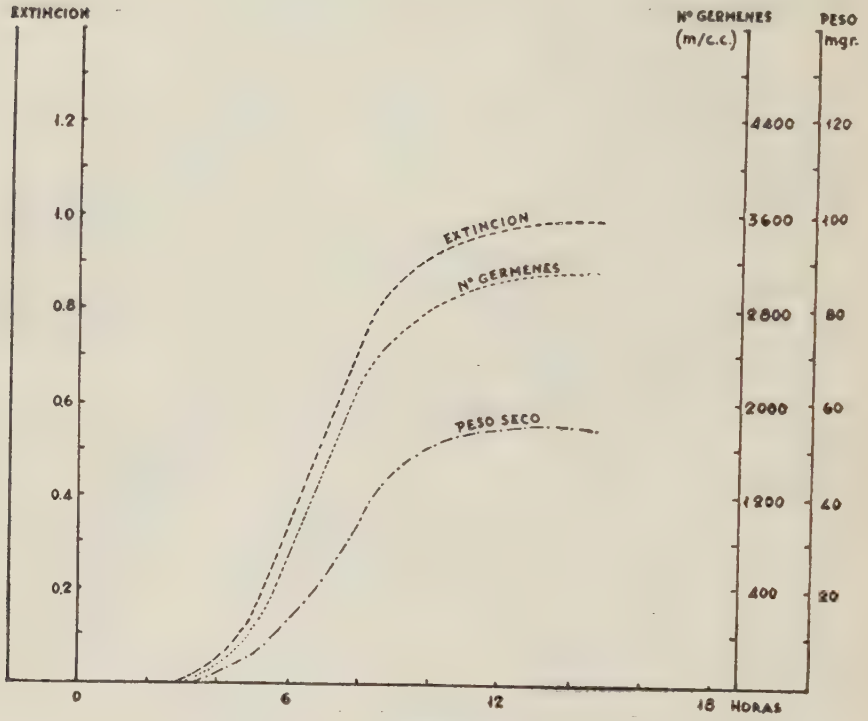
que se separa por centrifugación, se lava este precipitado dos veces con ATC al 5 por 100 y en los líquidos se encuentra el ácido ribonucleico que puede concentrarse por evaporación al vacío.

Damos a continuación un esquema general del proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos:


GERMENES DESECADOS ACETONA
A T C al 10 %
(centrifugar)
Tirar líquido
Precipitado
A T C al 10 %
(centrifugar)
Precipitado
Tirar líquido
etanol al 80 %
(centrifugar)
Tirar líquido
Precipitado
etanol absoluto
(centrifugar)
Precipitado
Tirar líquido
cloroformo-etanol (I:3)
(centrifugar)
Tirar líquido
Precipitado
éter
(centrifugar)
Precipitado
Tirar líquido
Na O H a 37°
(centrifugar)
Residuo
Liquido alcalino (RNA y DNA)
lavar con agua
líquido
Cl H 2,5 N/
A T C al 30 %
(centrifugar)
Tirar residuo
RNA (líquido)
DNA (precipitado)
A T C al 5 %
(centrifugar)
líquido

Una vez realizado el aislamiento de los ácidos nucleicos en el líquido alcalino, se puede ya realizar la determinación de los mismos, por reacciones específicas de sus componentes.

Nosotros realizamos las determinaciones de fósforo total por el método de Fiske y Subbarow (1925), que nos da los nucleicos totales del



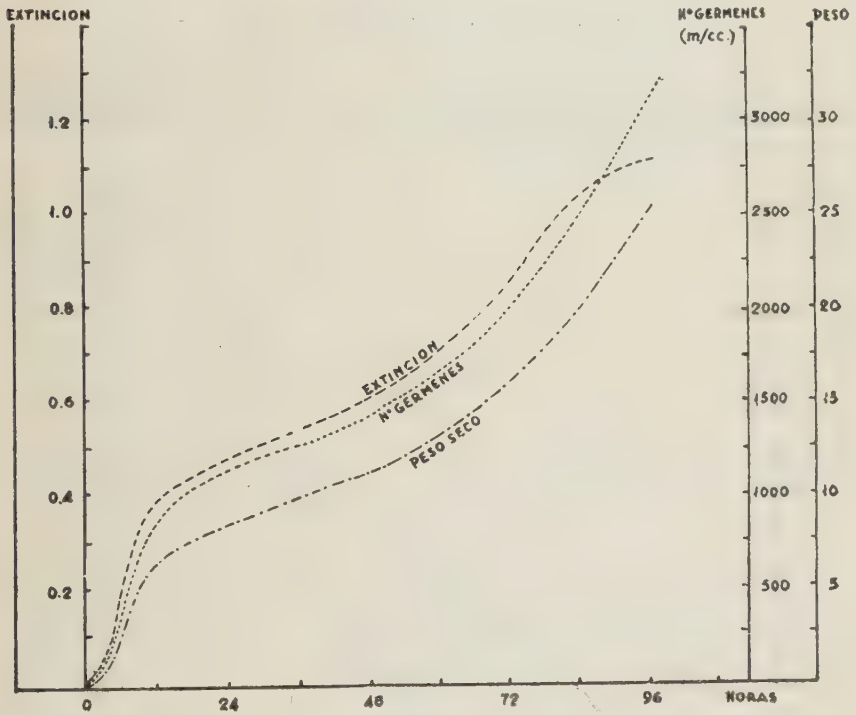
GRÁFICA 4.

líquido alcalino; determinamos la ribosa por el método del orcinol de Mejbaum (1939) y la deoxiribosa por el método de la difenilamina de Dische y Schwarz (1937), que nos dan el contenido en ribonucleico y deoxiribonucleico, respectivamente, llevando los resultados obtenidos a curvas estandard preparadas con ribonucleato sódico de levadura (Schwarz Inc.) con un 9 por 100 de fósforo y deoxiribonucleato sódico (Light Ltd.) con 7,9 por 100 de fósforo.

Todas estas reacciones colorimétricas se realizan en un fotocolorímetro Kipp, con filtro 66, para el fósforo y ribosa, y filtro 59 para la deoxiribosa.

RESULTADOS

Las experiencias realizadas en este trabajo se pueden dividir en dos fases. La primera es la que fija las curvas de crecimiento del *Escherichia coli* y la *Sarcina lutea* en diferentes condiciones de crecimiento,



Gráfica 5.

con objeto de determinar los tiempos de cada fase (lag, logarítmica, estacionaria, declive). La segunda consiste en la determinación de los ácidos nucleicos que corresponden a cada una de estas fases y construcción de las gráficas correspondientes para establecer las diferencias.

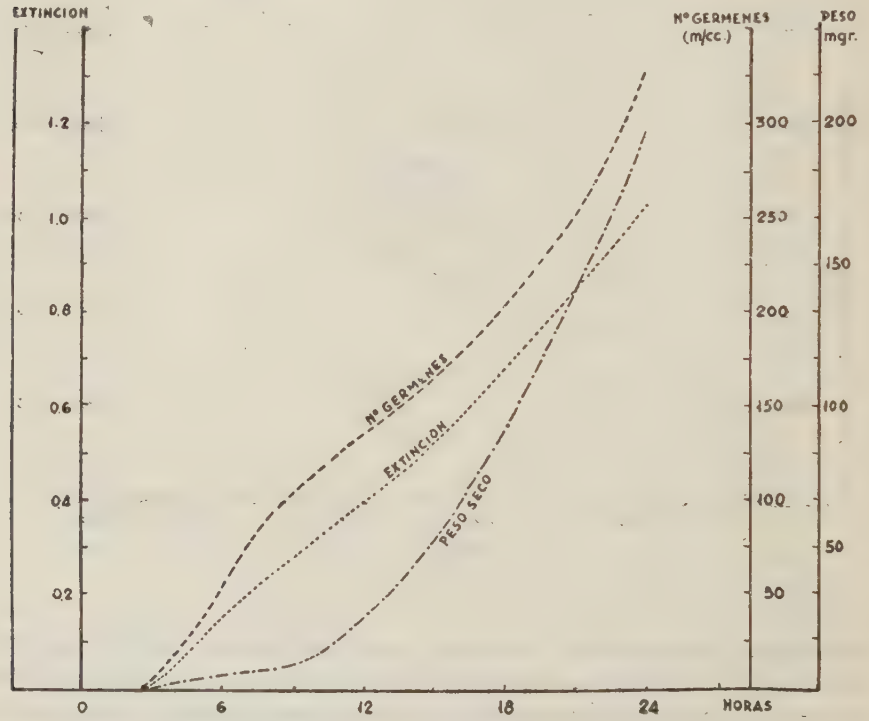
1. *Crecimiento* del Escherichia coli.

Damos las gráficas de crecimiento del *E. coli* (3, 4 y 5), expresadas en extinciones, número de gérmenes y peso seco. Las condiciones son las siguientes:

1.ª Crecimiento en caldo común, 28°, agitación, 72 horas.
2.ª Crecimiento en caldo común, 28°, agitación, 15 horas.
3.ª Crecimiento en caldo común, 37°, estufa, 96 horas.

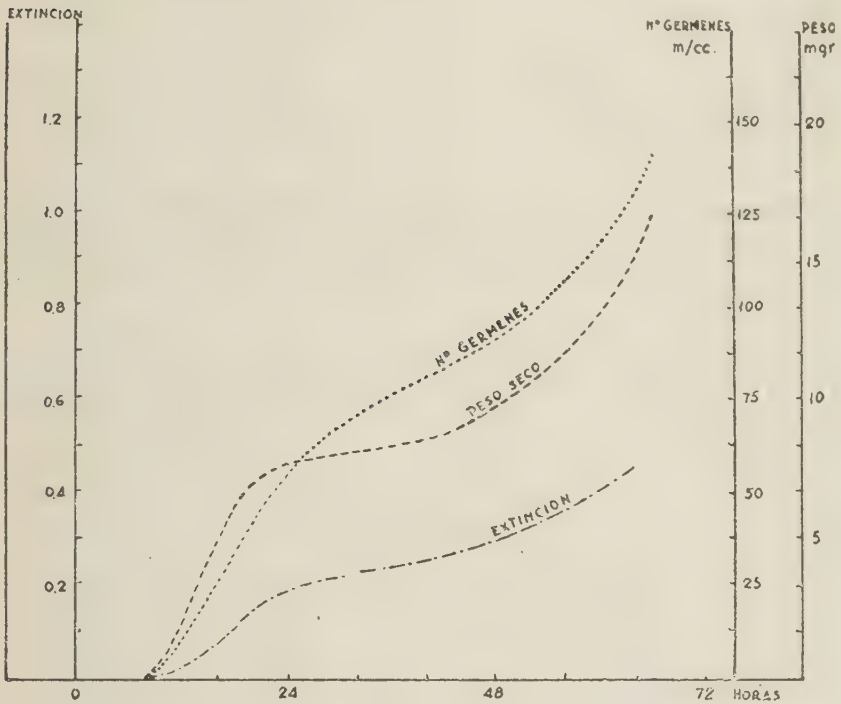
2. *Crecimiento de* Sarcina lutea.

A continuación se dan las gráficas de crecimiento de *Sarcina*, expresadas también en extinciones, número de gérmenes y peso seco. Las condiciones son las siguientes:



GRÁFICA 6.

1.ª Crecimiento en caldo común, 28°, agitación, 24 horas.
2.ª Crecimiento en caldo común, 37°, estufa, 66 horas.



GRÁFICA 7.

3. *Pruebas preliminares de aislamiento y determinación de ácidos nucleicos.*

A continuación se trata de aislar y determinar los ácidos nucleicos que hay en cada una de las fases de crecimiento antes mencionadas.

Previamente se realizan unas pruebas de aislamiento y determinación de ácidos nucleicos en cultivos de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* en caldo común a 28° y en agitación por cuarenta y ocho horas. Los métodos son los anteriormente señalados y los resultados finales los siguientes:

	E. coli	*B. subtilis*
Gérmenes desecados (total)	187,50 mgr.	203,20 mgr.
» » (muestra)	61,40 »	67,20 »
% fósforo (peso seco)	1,53 %	1,70 %
Nucleicos totales (líq. alcal.)	17,80 %	20,00 %
RNA (peso seco) (líq. alcal.)	9,70 %	13,80 %
DNA (peso seco) (líq. alcal.)	8,30 %	7,10 %

Observamos que la suma de los ácidos nucleicos obtenidos por determinación de los azúcares, da aproximadamente igual que el resultado obtenido por determinación de fósforo total (nucleicos tienen un 8,5 por 100 de fósforo).

A continuación se realiza la separación de los dos ácidos nucleicos en la forma indicada en los métodos. En cada una de las fracciones se determina fósforo total y el azúcar pentosa correspondiente. Los resultados finales son los siguientes:

	E. coli	*B. subtilis*
Fracción RNA: fósforo (p. s.)	0,85 %	0,96 %
» » nucleico total	9,40 %	10,00 %
» » RNA (p. s.)	5,31 %	5,50 %
Fracción DNA: fósforo (p. s.)	0,30 %	0,24 %
» » nucleico total	3,70 %	3,00 %
» » DNA (p. s.)	3,66 %	2,97 %

Los resultados obtenidos no concuerdan con los anteriores del líquido alcalino. Esto indica que el método de separación no es muy recomendable. Es por esta razón y también porque para el objeto que nos proponemos no es necesario, que en experiencias posteriores usamos en general las determinaciones realizadas en el líquido alcalino.

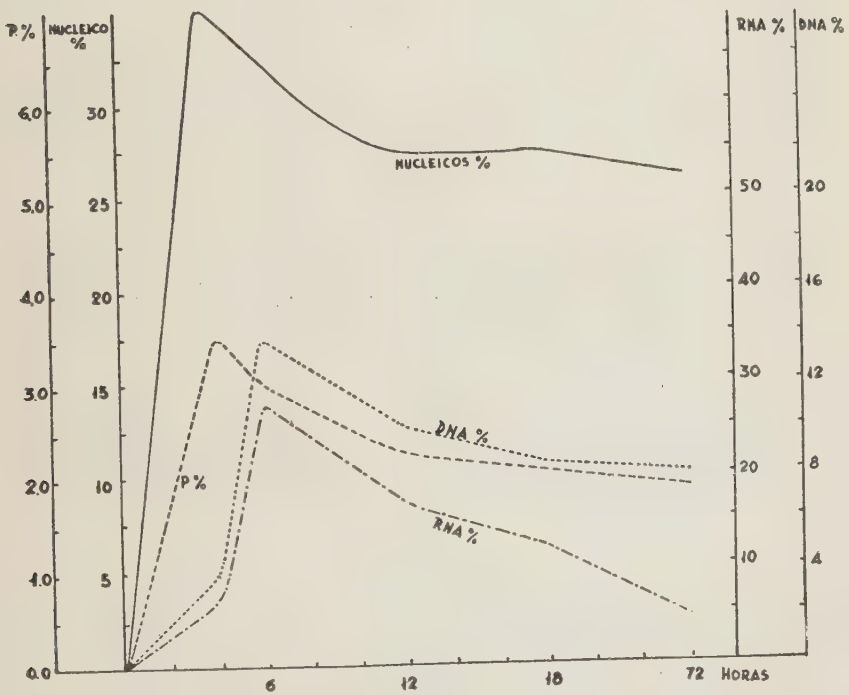
4. *Aislamiento y determinación de ácidos nucleicos en* E. coli.

Esta experiencia corresponde a los crecimientos dados en 1). Los resultados y gráficos son los siguientes:

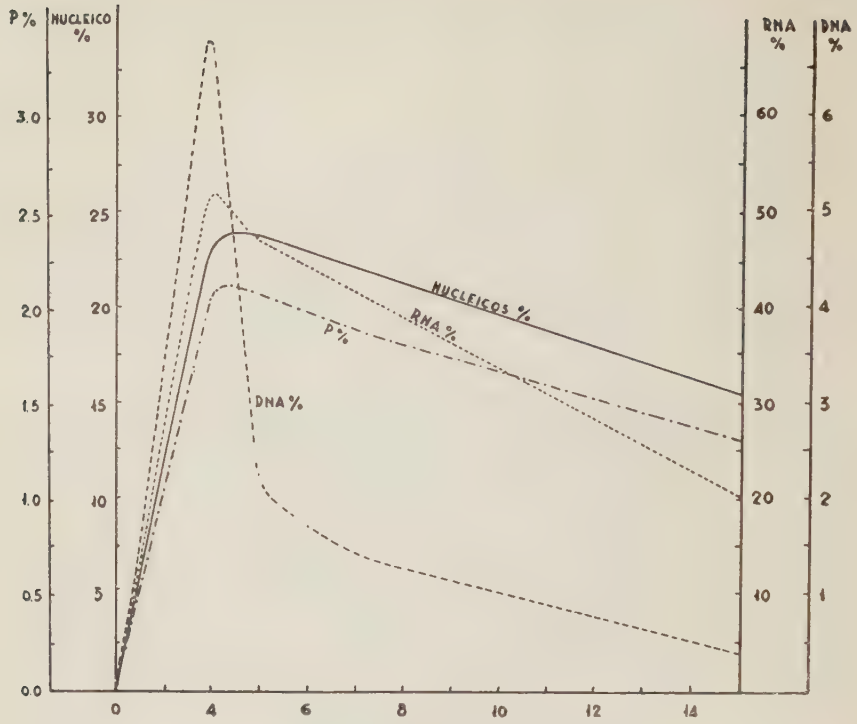
I

Horas	P % (p. s.)	Nucleicos %	RNA %	DNA %
4	3,56	41,80	6,80	5,60
6	3,00	35,20	28,80	15,80
12	2,31	27,10	16,30	9,00
18	2,20	28,80	12,50	8,00
72	1,90	22,48	4,80	8,10

Aquí se hace la separación de los dos ácidos; en la fracción RNA los resultados son concordantes, pero no los de la DNA, que está impurificada.



GRÁFICA 8.



GRÁFICA 9.

II

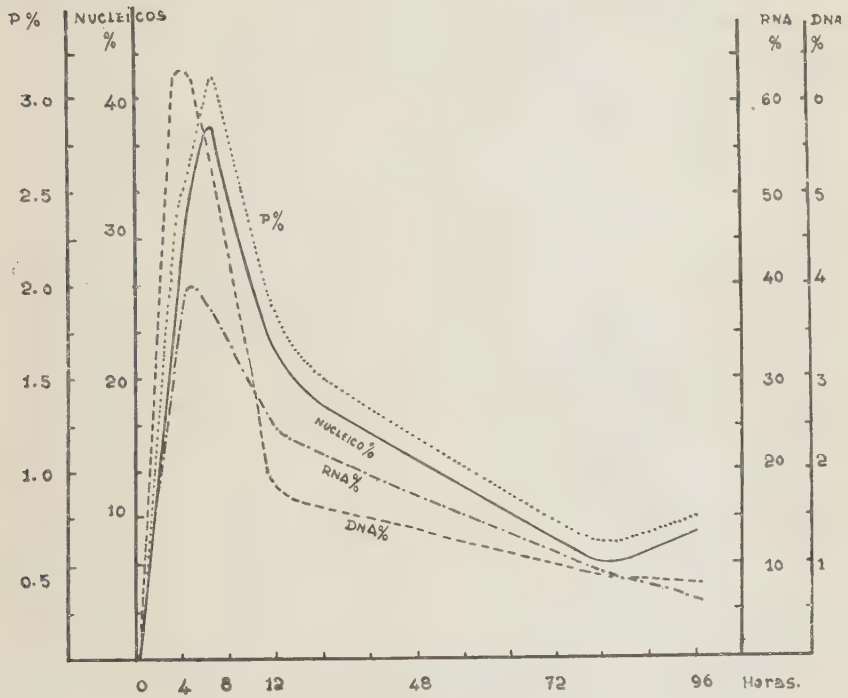
Horas	P % (p. s.)	Nucleicos %	RNA %	DNA %
4	2,10	24,60	53,50	6,60
5	2,10	24,60	45,90	1,70
6	2,00	23,50	42,80	1,80
7	1,90	22,30	37,10	1,40
15	1,30	15,20	20,00	0,44

III

Horas	P % (p. s.)	Nucleicos %	RNA %	DNA %
4	2,30	27,00	42,80	6,40
8	3,20	37,60	35,60	4,80
12	1,74	20,40	24,00	1,80
48	1,33	15,60	20,80	1,50
80	0,67	7,80	11,20	0,90
96	0,80	9,30	5,10	0,80

Observando los resultados y las gráficas anteriores que corresponden al contenido en ácidos nucleicos del *Escherichia coli* en caldo común y en diferentes condiciones de crecimiento, se hace notar una gran similitud en el contenido en ácidos nucleicos.

Desde el momento de la inoculación hasta el comienzo de la fase logarítmica, no se observa gran crecimiento (fase lag); en cambio, hay una síntesis intensa de ácidos nucleicos totales, RNA y DNA, que llega a un máximo al comienzo de la fase logarítmica, durante la cual dismi-



Gráfica 10.

nuyen rápidamente los ácidos nucleicos totales y RNA, y sobre todo el DNA. Durante la fase estacionaria se mantiene el mismo nivel de ácidos nucleicos o disminuye lentamente.

La fase lag termina en el crecimiento a 28° en agitación a las cuatro horas, durante la logarítmica de seis a doce horas. En crecimiento en

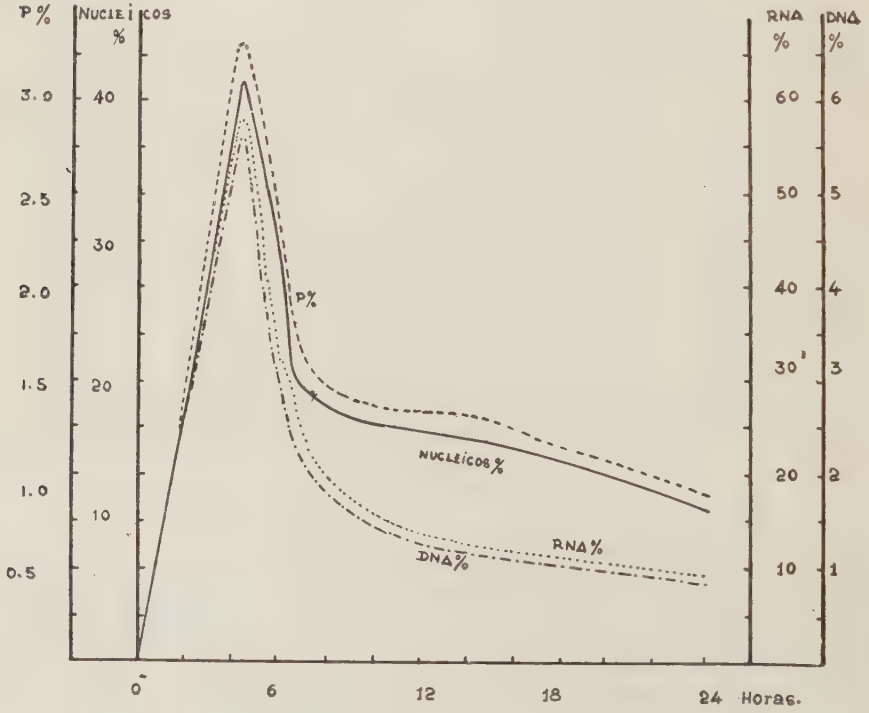
estufa a 37°, la fase lag termina a las cinco horas y la logarítmica a las veinticuatro horas.

5. *Aislamiento y determinación de ácidos nucleicos de* Sarcina.

Esta experiencia corresponde a los crecimientos dados en 2). Los resultados y gráficos son los siguientes:

1.º

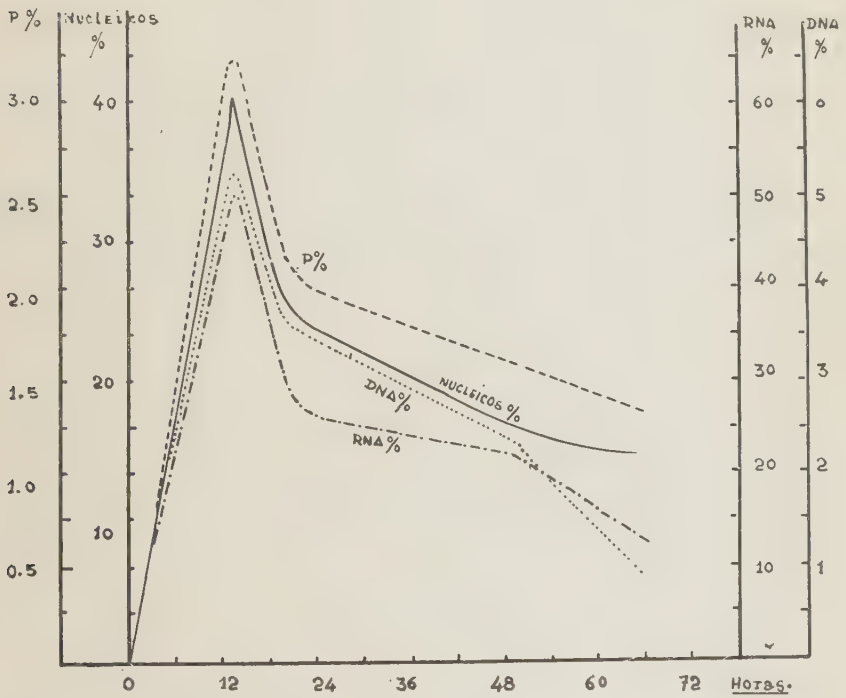
Horas	P % (p. s.)	Nucleicos %	RNA %	DNA %
5	3,56	41,80	56,00	5,70
6	2,60	30,50	39,60	3,90
7	1,50	17,60	21,70	2,70
15	1,30	15,20	11,60	0,96
24	0,90	10,50	9,20	0,84



Gráfica 11.

2.º

Horas	P % (p. s.)	Jucleicos %	RNA %	DNA %
14	3,50	41,80	52,00	5,00
20	2,10	24,70	35,00	2,90
50	1,66	16,50	21,40	2,60
66	1,30	15,20	9,80	1,10



GRÁFICA 12.

Observando los resultados y las gráficas anteriores que corresponden al contenido en ácidos nucleicos de la *Sarcina lutea* en caldo común y en diferentes condiciones de crecimiento, se nota cierta similitud en el contenido en ácidos nucleicos.

Desde el momento de la inoculación hasta el comienzo de la fase logarítmica, no se observa gran crecimiento; en cambio, hay una sín-

tesis intensa de ácidos nucleicos totales, RNA y DNA, que llega a su máximo al comienzo de la fase logarítmica, durante la cual disminuyen rápidamente los ácidos nucleicos totales, RNA y DNA. Durante la fase estacionaria se mantiene el mismo nivel o disminuye lentamente.

En este germen la fase lag termina en el crecimiento a 28° en agitación a las seis horas y en el crecimiento en estufa a 37° a las quince horas. Es decir, que el crecimiento logarítmico sufre retraso en relación al *E. coli*

DISCUSION Y RESUMEN

Si se añade una bacteria a un medio apto para que pueda desarrollarse, puede encontrarse que en su crecimiento pasa por una serie de fases con las cuales se puede construir una gráfica representativa.

A partir del momento de la siembra pasa un tiempo, durante el cual la mutiplicación es lenta, es lo que se llama la fase «lag», cuya duración está influída por diferentes factores. A continuación el cultivo entra en una fase de crecimiento rápido, fase «logarítmica», también influída por varios factores. A continuación hay una fase «estacionaria», durante la cual el número de bacterias es prácticamente constante, y aunque hay metabolismo, no hay crecimiento. Por último, viene la fase de «declive», en la que disminuye el número de bacterias, pudiendo autolizarse, es decir, disolverse por actividades enzimáticas.

Estas fases las pasan todos los microorganismos durante su desarrollo, y, por lo tanto, también las bacterias por nosotros estudiadas: *Escherichia coli* y *Sarcina lutea*. Estas fases pueden seguirse por diferentes métodos, como turbidez, número de gérmenes y peso seco. Así lo hacemos nosotros.

Observamos que en el *E. coli*, a 28° en agitación, el ciclo de crecimiento se completa en quince horas, mientras que en reposo es de noventa y seis horas. Los ciclos de *Sarcina* son, respectivamente, veinticuatro y sesenta y seis horas.

Una vez conocidas las fases de crecimiento, se hace el aislamiento y determinación de los ácidos nucleicos de cada fase, para construir las curvas que expresen el metabolismo de dichos ácidos, que, como todos los componentes celulares, sufren procesos de síntesis y de degradación. Utilizamos una modificación del método de Schmidt y Thannhauser

(1945), obteniendo los siguientes resultados, en cultivos de cuarenta y ocho horas en caldo común, a 28° en agitación:

	Nucleicos %	RNA %	DNA %
Escherichia coli...	17,80	9,70	8,30
Bacillus subtilis...	20,00	13,80	7,10
Sarcina lutea...	21,40	16,50	2,60

Las cifras obtenidas son mayores (a las cuarenta y ocho horas) que las obtenidas por Belozersky (1947) y Boivin y colaboradores (1947), sobre todo en lo que se refiere a DNA por ciento; en cambio, están de acuerdo en RNA por ciento con las de los últimos autores.

Las gráficas del metabolismo de producción de los ácidos nucleicos están de acuerdo con los resultados obtenidos por Levy y colaboradores (1949) y Morse y Carter (1949), que observan que la máxima cantidad de ácidos nucleicos se produce antes de la multiplicación de los gérmenes.

SUMMARY

Using an original modification of the Schmidt-Tannhauser, method the authors realize the isolation and determination of the nucleic acids in cultures of *Escherichia coli, Sarcina lutea* and *Bacillus subtilis,* and study the graphics that they obtain with the metabolism of production in these acids.

BIBLIOGRAFIA

ALTMAN, A. 1889. Arch. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 524.
AKARI, 1938. J. Biochem. Tokio. 28, 355.
AVERY, O. T., y colaboradores. 1944. J. Exp. Med. 79, 137.
BELOZERSKI, A. 1947. Cold Spring Harbor Symp. XII, I.
BENNETT, E. O., and VILLIAMS, P. 1954. Bact. Proc. 42.
BERNHEIMER, A. W. 1953. Biochem. J. 53, 53.
BOIVIN, VENDRELY and TULASNE. 1947.
BOREK, E.; RYAN, A., and ROCKENBACK, J. 1955. J. Bacteriol. 69, 460.
BROWE and JOHNSON. 1922. J. Biol. Chem. 54, 721.
COGHILL, R. D. 1931. J. Biol. Chem. 90, 57.
COGHILL, R. D. 1932. Chem. Zbl. I. 3307.

CHARGAFF, E. 1947. Cold Spring Harbor Symp. XII, 38.
CHARGAFF, E., and SAIDEL, H. F. 1949. J. Biol. Chem. 177, 147.
CHARGAFF, E. 1950. Experientia. 6, 201.
CHARGAFF, E., and DAVISON,, J, N. 1955. Nucleic Acids. Academic Press.
DISCHE, Z. and SCHWARZ, K. 1937. Microchim. Acta. 213.
DUTTA, S. K.; JONES, A. S., and STACEY, M. 1953. Biochem. Biophys. Acta. 10, 613.
DUTTA, S. K.; JONES, A. S., and STACEY, M. 1956. J. Gen. Microbiol., 14, 160.
FISKE, C. H., and SUBBARROW. 1925. J. Biol. Chem. 66, 375.
FITZ-JAMES, P. C. 1954. Can. J. Microbiol. I. 502.
FITZ-JAMES, P. C. 1954. J. Bacteriol. 69, 464.
GANDELMAN, B.; ZAMENHOFF, S., and CHARGAFF, E. 1952. Biochem. Biophys. Acta. 9. 399.
HEIDELBERGER. 1925. J. Exp. Med. 42, 367.
HEIDELBERGER and KENDALL. 1931. J. Exp. Med. 54, 515.
JONES, A. S. 1951. Chem. and Eng. 1067.
JONES, A. S. 1953. Biochem. Biophys. Acta. 10, 607 y 610.
KELNER, A. 1953. J. Bacteriol. 65, 252.
KHOUVINE, Y.; BARBIER, M., and WYSMAN, L. 1953. Compt. Rendus. 236, 2118.
LABAW, L. W.; MOSLEY, V. M., and WYCKROFF, R. W. 1950. J. Bacteriol. 59, 251.
LEVENE, P. A., and JACOBS, W. A. 1909. Ber. 42, 2102, 2469, 2474, 2703.
LEVENE, P. A.; MIKESKA, L. A., and MORI, T. 1930. J. Biol. Chem. 85, 785.
LEVENE, J., and BASS, L. W. 1931. Nucleic Acids. Chemical Catalog.
LEVY, H. B.; SKUTCH, E. T., and SCHADE, A. L. 1949. Arch. Biochem. 24, 199.
LEVY, H. B.; SKUTCH, E. T., and SCHADE, A. L. 1949. Arch. Biochem. 24, 437.
MALMGREN, B., and HEYDEN, C. G. 1947. Acta. Path. Michobiol. Scand. 24, 437.
MARUYAMA, Y. 1956. J. Bacteriol. 72, 821.
MEJBAUM, W. 1939. Z. physiol. Chem. 258, 117.
MIESCHER. 1871. Hoppe-Seyler Med. Chem. Unters. 441.
MITCHELL, P. 1950. J. Gen. Microbiol. 4, 399.
MITCHELL, P., and MOYLE, J. 1951. J. Gen. Microbiol. 5, 421.
MITCHELL, P., and MOYLE, J. 1953. J. Gen. Microbiol. 9, 257.
MITLHELL, P., and MOYLE, J. 1954. J. Gen. Microbiol. 10, 533.
MORGAN, D. M., and WADE, H. E. 1957. Biochem. J. 65, 321.
MORSE, M. L., and CARTER, C. E. 1949. J. Bacteriol. 58, 317.
NEWTON, J. N., and WILSON, J. B. 1955. J. Bacteriol. 69, 677.
OVEREND, W. G.; STACEY, M., and WEBB, M. 1951. J. Gen. Microbriol. 5, 268.
PARDEE, A. B., and PRESTIDGE, L. S. 1956. J. Bacteriol. 71, 677.
PARSON, C. H. Jr. 1953. Arch. Biochem. Biophys. 47. 76.
PETRICK, F. G. 1944. J. Bacteriol. 48, 347.
PETRICK, F. G. 1946. J. Bacteriol. 51, 539.
REDDI, K. K., and WATSON, R. W. 1954. Can J. Microbiol. I, 125.
SEVAG, LACKMAN and SMOLENS. 1938. J. Biol. Chem. 124, 425.
SEVAG, LACKMAN and SMOLENS. 1940. J. Biol. Chem. 134, 523.
SCHAFER. 1932. Johns Hopkins Hosp. Bull. 33, 151.
SCHMIDT, G., and THANNHAUSER, S. J. 1945. J. Biol. Chem. 161, 83.
SCHNEIDER, M. D. 1952. J. Bacteriol. 63, 495.

SCHNEIDER, W. S. 1945. J. Biol. Chem. 161, 293.
SHERROTT, H. S. A., and THOMAS, A. T. 1953. J. Gen. Microbiol. 8, 217.
SIMINOVITCH, L., and GRAHAM, A. F. 1954. Can. J. Microbiol. I, 721.
SIMINOVITCH, L., and GRAHAM, A. F. 1956. Can. J. Microbiol. 2, 585.
SMITH, J. D., and WYATT, G. R. 1951. Biochem. J. 49, 144.
SMOLENS, J., and VOGT, A. B. 1953. J. Bacteriol. 66, 140.
STACEY, M. 1947. Symp. Soc. Exp. Biol. I, 86.
STOKLASA. 1925. Z. Bakt. Abt. 2, 21, 260.
THOMSON and DUBOS. 1938. J. Biol. Chem. 125, 65.
VISCHER, E., and CHARGAFF, E. 1947. J. Biol. Chem. 168, 781.
VISCHER, E.; ZAMENHOFF, S., and CHARGAFF, E. 1949. J. Biol Chem. 177, 429.
WADE, H. E. 1952. J. Gen. Microbiol. 7, 18.
WELLERSON, R. Jr., and TETRAULT, P. A. 1955. J. Bacteriol. 69, 449.
ZAMENHOFF, S.; LEYDY, G.; ALEXANDER, H. E.; FITZGERALD, P. L., and CHARGAFF, E. 1952. Arch. Biochem. Biophys. 40, 50.
ZAMENHOFF, S.; BRAWERMAN, G., and CHARGAFF, E. 1952. Biochem. Biophys. Acta. 9, 402.

NUEVO DIRECTOR

Ha sido nombrado Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, el profesor doctor don Lorenzo Vilas López, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Madrid y actual Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Depósito Legal M. 702 - 1958

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Ejemplar, 110 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Ganadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 peretas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativo al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 30 pesetas. Suscripción anual (4 números): 110 pesetas.

A. LOBO. - Libertad, 33 - Teléf. 21 31 61 - MADRID

CONSEJO·SVPERIOR·DE·INVESTIGACIONES·CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA
ESPAÑOLA